FACULTE DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1962

THÈSE N° 1103

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Hubert, Marie, Edmé BLANCHET

Interne des Hôpitaux de Paris

Né le 28 Juin 1925, à VOUE (Aube)

Présentée et soutenue publiquement le 1962

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU DOSAGE DE L'HAPTOGLOBINE PAR UNE METHODE AUTOMATIQUE

Président : Monsieur M. F. JAYLE (Professeur)

D. P. TAIB

8, Rue Casimir Delavigne

PARIS - VI°

1962

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. ALAJOUANINE (T), AUBIN (A), BENARD (H), BULLIARD (H), CADENAT (F), CHABROL (E), CHAMPY (C), DEBRE (R), FEY (B), GASTINEL (P), HALPHEN (E), HAZARD (R), HEUYER (G), LANTUEJOUL (P), LAROCHE (G), LEVY-SOLAL (E), LIAN (C), MATHIEU (P), MOCQUOT (P), MONDOR (H), MONOD (R), MOREAU (R), MOULONGUET (P), OLIVIER (E), PASTEUR VALLERY-RADOT, PETIT-DUTAILLIS (D), QUENU (J), RICHET (C), SENEQUE (J), STROHL (A), TANON (L).

DOYEN ..... Léon BINET
Membre de l'Institut

1er ASSESSEUR ..... Jean VERNE
2e ASSESSEUR ..... Gaston CORDIER

I - PROFESSEURS

Iº- CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a) Professeurs titulaires :

	MM.
Anatomie	DELMAS (A)
Anatomie pathologique	DELARUE (J)
Anesthésiologie	BAUMANN (J)
Biochimie médicale	JAYLE (M.F) SCHAPIRA (G)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux sports	CHAILLEY-BERT (P)
Biologie médicale	FAUVERT (R)
Cancérologie médicale et sociale	BERNARD (J)
Embryologie	GIROUD (A)
Histoire de la médecine et de la chirurgie (Lariboisière)	N...
Histologie	VERNE (J)
Hygiène et médecine préventive	JCANNON (P)
Médecine du Travail	DESOILLE (H)
Médecine légale	PIEDELIEVRE (R)
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R)
Parasitologie	GALLIARD (H)
Pathologie chirurgicale	HUGUIER (J)
Pathologie exotique	LAVIER (G)
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.P)
Pathologie médicale	MILLIEZ (P)

MM.

Pathologie respiratoire ..... TURIAF (J)
Pathologie et thérapeutique générales ..... BOUDIN (G)
Pharmacologie ..... CHEYMOL (J)
Physiologie ..... BINET (L) / BARGETON (D)
Physiologie et pathologie obstétricale ..... LEPAGE (F)
Physique médicale ..... DOGNON (A) / DJOURNO (A)
Radiologie médicale ..... DESGREZ (H)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale ..... N...
Thérapeutique ..... CONTE (M)

b) Professeurs à titre personnel:

Biochimie medicale ..... DESGREZ (P) / POLONOVSKI (J)
Biologie médicale ..... BOURLIERE (F)
Embryologie ..... TUCHMANN (H)
Hygiène et médecine préventive ..... DEPARIS (M)
Parasitologie ..... BRUMPT (L.C)
Pathologie chirurgicale ..... LAURENCE (G)
Pharmacologie ..... LEVY (Mlle J)
Physiologie ..... PARROT (J)
Physique médicale ..... KELLERSHOHN (L)

2°- CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a) Professeurs titulaires

Clinique carcinologique chirurgicale (Necker) ..... REDON (H)
Clinique cardiologique (Broussais) ..... MOUQUIN (M)
Cliniques chirurgicales (Beaujon ..... LORTAT-JACOB (J.L)
(Cochin ..... LEGER (L)
(Hôtel-Dieu ..... PATEL (J)
(Pitié ..... CORDIER (G)
(Saint-Antoine ..... GOSSET (J)
(Salpêtrière ..... SICARD (A)
(Tenon ..... OLIVIER (Cl.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants Malades) FEVRE (M)
Clinique chirurgicale orthopédique et réparatrice (Cochin) ..... MERLE d'AUBIGNE (R
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais) ..... F. de GAUDART d'ALLAINES

	MM.
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laennec)	MATHEY (J)
Clinique endocrinologique (Pitié)	DECOURT (J)
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades)	LAMY (M)
Clinique gynécologique (Broca)	FUNCK-BRENTANO (P)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)	DEGOS (R)
Clinique des maladies des Enfants (Enfants-Malades)	CATHALA (J)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)	MOLLARET (P)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)	DELAY (J)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)	HAMBURGER (J)
Clinique des maladies du sang (Broussais)	MARCHAL (G)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)	CASTAIGNE (P)
Cliniques médicales (Boucicaut	LENEGRE (J)
(Broussais	SOULIE (P)
(Cochin	JUSTIN-BESANÇON (L)
(Cochin	BROUET (G)
(Hôtel-Dieu	BARIETY (M)
(Lariboisière	SEZE (S.de)
(Pitié	DREYFUS (G)
(Saint-Antoine	KOURILSKY (R)
Clinique médicale d'hydrologie thérapeutique et climatologie (Bichat)	DEBRAY (C)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	GENNES (L.de)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu)	DEROT (M)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R)
Cliniques obstétricales (Baudelocque	LACOMME (M)
(Foch (Suresnes)	MERGER (R)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	VARANGOT (J)

	MM.
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	RENARD (G)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	AUBRY (M)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	LELONG (M)
Clinique de pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laennec)	BERNARD (E)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	COSTE (F)
Clinique stomatologique (Pitié)	DECHAUME (M)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	ROUX (M)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	LEMAIRE (A)
Clinique toxicologique	GAULTIER (M)
Clinique traumatologique	PADOVANI (P)
Séméiologie médicale	DOMART (A)
Séméiologie et clinique chirurgicales	POILLEUX (F)
Clinique urologique (Necker)	COUVELAIRE (R)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	TURPIN (R)

b) Professeurs à titre personnel :

Médecine	BOUR (H) LHERMITTE (F) PEQUIGNOT (H)

II - PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGREGES ET MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES

	MM.
Anatomie	CABROL (C) GOUINAUD (C) GILLOT (C) OLIVIER (G)
Anatomie pathologique	GAUTHIER-VILLARS(Mlle pr.s.ch. ABELANET (R) BUSSER (F)

	MM.
Anatomie pathologique	CHOMETTE (G) GOUYGOU (Ch)m.conf. NEZELOFF (Ch.) ORCEL (L) PAILLAS (J)
Anesthésiologie	KERN (E.) VOURC'H (G)
Bactériologie	BARBIER (P) CHRISTOL (D) Le MINOR (L) TOURNIER (P)
Biochimie médicale	BAULIEU Et.m.conf. BOURILLON (R) CARTIER (P) DREYFUS (J.Cl.) GONNARD (P) KRUH (J) JEROME (H)
Biologie appliquée à l'Education Physique et aux Sports	PLAS (F)
Carcinologie	BOIRON (M) DENOIX (P) MATHE (G) SELIGMANN (M)
Dermato-Syphiligraphie	CIVATTE (J) DUPERRAT (B)
Electro-Radiologie	LEDOUX-LEBARD (G)
Hématologie	BESSIS (M) BILSKI-PASQUIER (G) DAUSSET (J) DUHAMEL (G)
Histologie	COUJARD (R)pr.s.ch. MAROIS (M) RACADOT (J)
Hydrologie	BESANCON (F) CORNET (A)
Hygiène	BOYER (J)pr.s.ch. BLANCHER (G) CORRE-HURST (Mme L) SAPIN-JALOUSTRE (H)
Maladies infectieuses	BASTIN (R) DUPONT (V)

	MM.
Médecine légale	DEROBERT (L)pr.s.ch.
	FOURNIER (E)
	GUENIOT (M)
	HADENGUE (A)
Médecine du travail	ALBAHARY (C)
Neuro-Chirurgie	PERTUISET (B)
Obstétrique	GRANJON (A)
	HERVET (E)
	Le LORIER (G)
	LEVY (J)
	MORIN (P)
	MUSSET (R)
	ROBEY (M)
	SENEZE (J)
	SUREAU (C)
	THOYER-ROZAT (J)
Ophtalmologie	BREGEAT (P)
	DUBOIS (A)
	SARAUX (H)
Orthopédie	JUDET (R)
	MEARY (R)
	POSTEL (M)
	RAMADIER (J)
Oto-rhino-Laryngologie	DEBAIN (J)
	PIALOUX (P)
Parasitologie	GOLVAN (Y)
	LAPIERRE (J)
Pathologie chirurgicale	BARCAT (J)
	BINET (J.P)
	CAUCHOIX (J)
	CERBONNET (G)
	CHATELIN (C.L)
	DUBOST (Ch.)
	DUBOST (Cl.)
	FAUREL (J)
	FLABEAU (F)
	GARBAY (M)
	GARNIER (H)
	(Cl.de)GAUDART-d'ALLAIN
	GERMAIN (A)
	LATASTE (J)
	LEVEQUE (B)
	LOYGUE (J)
	MERCADIER (M)

	MM.
Pathologie chirurgicale	NATALI (J) PELLERIN (J) PERROTIN (J) ROBERT (H) THOMERET (G)
Pathologie exotique	SCHNEIDER (J)
Pathologie expérimentale	BENHAMOU (J.P) BERTHAUX (P) BOIVIN (P) CROSNIER (J) HARTMANN (L) LOEPER (J) MAURICE (J) MIKOL (Cl) RICHET (G)
Pathologie médicale	AUSSANNAIRE (M) BOUVIER (J) BOUVRAIN (Y) BRICAIRE (H) BRISSAUD (H) BROCARD (H) BUGE (A) CATINAT (J) CHRETIEN (J) COBLENTZ (B) CONTAMIN (F) COURY (C) ETIENNE (J.P) FREZAL (J) FRITEL (D) HENNEQUET (A) HIMBERT (J) HOUSSET (E) LAROCHE (Cl) LESOBRE (R) MACREZ (C) MOREAU (L) NICK(J) ROYER (P) TOURNEUR (R) WOLFROMM (R)
Pédiatrie-Puériculture	JOSEPH (R) LAFOURCADE (J) LEPERCQ (G) MANDE (R)

	MM.
Pédiatrie-Puériculture	MOZZICONACCI (P) POLONOVSKI (C) ROSSIER (A) VIALATTE (J)
Pharmacologie	BOISSIER (J) LECHAT (P)
Physiologie	BARRES (G) DEJOURS (P) DURAND (J) GIRARD m.conf. HUGELIN (A) SCHERRER (J)
Physique médicale	CHANTEUR (J) GOUGEROT (L)m.conf. pr.s.ch. GREMY (F.)m.conf. MILHAUD (G) PELLERIN (P) ROUCAYROL (J.Cl) TUBIANA (M) m.conf.
Pneumo phtisiologie	KREIS (B) MEYER (A) RENAULT (P)
Psychiatrie	PICHOT (P)
Psychiatrie infantile	DENIKER (P) DUCHE (D) FLAVIGNY (H) LAPRESLE (J)
Rhumatologie	DELBARRE (F)
Stomatologie	CERNEA (P) CHAPUT (Mme A.)m.c.ag GRELLET (M)
Thérapeutique	CHASSAGNE (P) LAMOTTE (M) MARCHE (J)
Urologie	AUVERT (J) MOULONGUET (A) QUENU (L)

III - PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE à titre permanent

	MM.
Anatomie	DEBEYRE (J)

MM.

Clinique chirurgicale ..... ABOULKER (P)
AMELINE (A)pr.s.ch.
VERNE (J.M)

Clinique médicale ..... PERRAULT (M)
RAMBERT (P)
THIEFFRY (S)

Clinique obstétricale ..... GRASSET (J)
MAYER (M)

Clinique ophtalmologique ..... DESVIGNES (P)
OFFRET (G)

Clinique oto-rhino-laryngologique ..... MADURO (R)

Clinique pédiatrique et puériculture ..... LAPLANE (R)

Clinique psychiatrique ..... BARUK (H)

Clinique urologique ..... KUSS (R)

IV - PROFESSEURS DETACHES DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

Bactériologie ..... HAUDUROY (P)Pr.s.ch.

Pathologie chirurgicale ..... RUDLER (J) Pr.s.ch.

V - CHARGES DE COURS D'HYGIENE SCOLAIRE ET UNIVERSITAIRE

BOLTANSKI (E)
LAUNAY (C)

Secrétaire général de la Faculté ... M. LENA (J)

Secrétaire principal ..... Mlle CHAINTREUIL (G)

Conservateur en Chef de la Bibliothèque
Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine ..... M.le Docteur HAHN (A)

Conservateur ..... Mlle DUMAITRE (P)

Bibliothécaires ..... Mmes CONTET (J), FORGET (F)
Mlles LAURENT (H), Le NOIR (G)
QUIEVREUX (E)

Par délibération en date du 9 decembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A notre Maître et Président de Thèse,

Monsieur le Professeur M-F. JAYLE,

Professeur de Biochimie Médicale à
la Faculté de Médecine de Paris,
Officier de la Légion d'Honneur,

Qui nous a accueilli et
nous a fait le grand
honneur d'accepter la
présidence de cette
thèse.

En témoignage de notre
profonde reconnaissance
et de notre respectueuse
admiration.

A mon Maître,

Monsieur le Dotteur J. BOY,

Chef du Service de Biologie au Centre Hospitalier Universitaire de Reims,

Qui a bien voulu m'accueillir dans son service, m'indiquer un sujet de thèse et me consacrer de précieux instants pour me faire bénéficier de ses recherches en des travaux qui lui tiennent à coeur.

Je le prie de trouver ici l'expression de mes remerciements les plus vifs et de ma respectueuse gratitude.

Au R.P. J. MORETTI,

Maître de Recherche au C.N.R.S.,

Qui a bien voulu nous guider patiemment et nous entourer de ses conseils si riches d'expérience pour la mise au point de ce travail.

En témoignage de notre sincère et respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur P. DESGREZ,

A Monsieur R. GOT,
Chef de Travaux,

Et

A tous les collaborateurs du groupe de préparation au Certificat d'Etudes Spéciales de Biochimie Médicale,

Pour leur compréhension et leur aide dans la voie que nous nous sommes tracée.

En témoignage de notre gratitude.

A tous nos Maîtres de l'Ecole Nationale
de Médecine

et

du Centre Hospitalier et Universitaire
de Reims.

Au Docteur G. DROPSY,

En remerciement pour l'accueil amical qu'il nous a toujours réservé.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU DOSAGE DE L' HAPTOBLOBINE PAR UNE METHODE AUTOMATIQUE

-:-:-:-:-

INTRODUCTION

-:-

L'haptoglobine a été decouverte en 1938 par POLONOVSKI et JAYLE (26). Lors de ses travaux sur l'action peroxydasique de l'hémoglobine, JAYLE (9-25) s'aperçut qu'en ajoutant à de l'hémoglobine de petites quantités de sérum, on augmentait dans de larges proportions l'activite peroxydasique de l'hemoglobine. Poursuivant ses études (10), il montra que cette propriété du sérum est liée à une globuline à laquelle il donna le nom d'"haptoglobine" (du grec hapto = je fixe) (abréviation courante:Hp).

Ses travaux ultérieurs devaient montrer qu'il s'agit bien d'une fixation de cette proteine sur l'hémoglobine, leur union molécule à molecule donnant un complexe stable (11).

Depuis vingt ans, l'haptoglobine a donné lieu à des recherches touchant de nombreux domaines et il ne fait plus de doute qu'elle présente de nombreux centres d'intérêt, pour les chimistes, les physiciens et les biologistes (2-4-6). Mais il n'est pas dans notre intention de rapporter tous ces travaux, car ils debordent le cadre que nous nous sommes fixé.

Pourtant, il nous semble difficile de les passer entièrement sous silence car, chaque

étude, dans son domaine propre, se réfère aux recherches qui l'ont précédée ; nous avons essayé d'apporter notre modeste contribution en modifiant une technique de dosage de l'Hp. Il nous a été pourtant nécessaire de nous appuyer sur de nombreuses investigations ayant elles-mêmes etayé les connaissances actuelles sur la question (même dans des domaines apparemment éloignés de notre objet). Nous ne pouvons moins faire que de citer nos principales sources.

En dehors des travaux traitant des principes sur lesquels nous nous sommes appuyés, cités tout au cours de notre exposé, nous avons tenu compte des faits suivants :

- après sa decouverte de 1938 citée ci-dessus et sa mise au point en 1940 d'une méthode de dosage de l'Hp,

- avec GILLARD puis ABDELLATIF (16-5), JAYLE a essayé de preparer l'Hp de Cheval par précipitation fractionnée à l'aide de divers sels neutres.

- JAYLE et ABDELLATIF (12), par la même technique, mettaient en évidence la richesse de l'Hp en glucides.

- avec CONAS (15), l'étude du complexe Hb-Hp leur fait estimer pour 100 ml d'un sérum normal la teneur de l'Hp à 132 à 139 mg pour la fraction protéique et à 7 à 9 mg, la fraction glucidique.

- JAYLE et BADIN (13) établissent que la migration électrophorétique à pH 8,6 du complexe Hb-Hp est du type alpha-2 globulinique.

- une étude polarographique des mucoïdes a été entreprise par JAYLE, SERPICELLI et ROBERT en 1956 (18)

- L'étude de l'Hp par la méthode électrophorétique en gel d'amidon devait compléter toutes ces recherches.

- L'intérêt que l'Hp présente du point de vue génétique a été mis en evidence par SMITHIES (29) et confirmé par MARNAY, MORETTI et JAYLE en 1958 (19)

- L'obtention à l'etat pur de l'Hp (1-14), la détermination de sa constitution chimique et de la plupart de ses proprietés physiques corroboraient l'ensemble.

Quant aux cliniciens, leur intérêt a été éveillé par le fait que le taux de l'Hp augmente considérablement dans tous les états d'ordre inflammatoire.

JAYLE et ses élèves ont fait du dosage de l'Hp une étude clinique extrêmement complète (8). Dès 1945, ils ont préconisé ce dosage en vue du dépistage systématique de maladies inapparentes du point de vue clinique. Il est certain qu'actuellement, il est très intéressant d'inclure cet examen parmi les épreuves à faire subir systématiquement à des personnes, tout au cours de leur vie. Un dosage d'Hp isolé a une valeur beaucoup moindre qu'une courbe évolutive de l'Hp pendant une longue période ; il est certain également que les modifications du taux de l'Hp ne mettront pas en évidence "toutes" les maladies inflammatoires quelle qu'en soit la nature ; mais à notre avis, lorsque le taux de l'Hp peut être associé, d'une part, avec la vitesse de sédimentation, d'autre part

avec d'autres tests, tels que les examens fonctionnels du foie, la formule sanguine, la numération globulaire, il permet, soit dans le cadre de la médecine systématique, soit même dans le cadre de la pathologie, de tirer des enseignements extrêmement intéressants.

Mais, pour qu'une méthode aussi précieuse puisse donner le maximum de renseignements, il nous apparaît important qu'elle soit énormément diffusée, ce qui nécessite une technique de dosage simple ; c'est pourquoi nous avons cherché à mettre au point une technique de dosage de l'Hp qui joigne, à des qualités de simplicité, une exactitude satisfaisante pour l'interprétation du clinicien.

Nous allons donc, dans les pages qui vont suivre, exposer les principes des différentes méthodes du dosage de l'Hp, étudier ensuite les avantages et les inconvénients de chacune de ces méthodes, avant de passer à la description de la technique de la méthode automatique, de discuter ses avantages et ses inconvénients. Au cours de cette étude de la méthode automatique, nous donnerons les constatations que nous avons faites relatives aux différents facteurs qui interviennent dans la réaction, avec le souci de nous mettre, le plus possible, à l'abri des causes d'erreur.

-:-

- I -

LES PRINCIPES DU DOSAGE DE L'HAPTOGLOBINE

-:-

Le dosage de l'Hp résulte des travaux de JAYLE (8). Contrairement aux dosages d'autres globulines, ou même d'autres protéines en général, il s'agit d'un dosage chimique ; ce qui, notons-le en passant, est un enorme avantage, étant donné que l'on peut toujours reprocher aux dosages habituellement employés pour identifier les différentes globulines, d'utiliser des réactions de précipitation, le dosage final de la globuline se faisant par une mesure opacimétrique. Outre les incertitudes et les inexactitudes qui peuvent résulter d'un dosage turbidimétrique, on ne peut jamais être certain de la spécificité d'une précipitation lorsqu'elle se fait dans un milieu protéique complexe comprenant des globulines et des albumines de poids moléculaires extrêmement différents.

Les travaux de GRABAR et de Melle de VAUX ST CYR (30) ont en outre montré que certaines précipitations sont d'autant moins spécifiques que l'équilibre des protéines s'éloigne de la normale, et ne le sont plus du tout dans les sérums où l'équilibre protéique est très perturbé. De toutes manières, par ce procédé, on entraîne toujours une fraction voisine, dans des proportions plus ou moins importantes.

Pouvoir être exécuté par une méthode chimique est donc une supériorité du dosage de l'Hp sur celui d'une autre mucoprotéine, l'orosomucoïde, qui suscite un intérêt chaque jour grandissant, mais qui nécessite une précipitation dans le filtrat perchlorosoluble de l'orosomucoïde par l'acide tungstique.

On peut distinguer quatre méthodes de dosage de l'Hp dont les résultats ont été comparés récemment par WAKS : (31)

- les deux méthodes de JAYLE
  de saturation
  et d'activation

- la méthode électrophorétique de NYMAN (24)
- la méthode cinetique de SMITHIES,
  et la variante d'OWEN

Elles diffèrent :

- de par les phénomènes utilisés,
- de par le pH du milieu de réaction,
- de par la nature de l'hémoglobine (Hb) employée : humaine
  de Cheval
  ou méthémoglobine (MetHb),
- de par le peroxyde utilisé :
  peroxyde d'hydrogène
  peroxyde d'éthyle,
- de par le substrat oxydé :
  iode
  gaïacol

Mais c'est la propriété que possède l'Hp de former un complexe stable avec l'Hb qui est toujours utilisée.

Les dosages chimiques de l'Hp reposent donc en fait sur le même principe quelle que soit la méthode employée ; en dessous du point de saturation de l'Hb utilisée par le plasma choisi, et dans des conditions expérimentales déterminées, le pouvoir peroxydasique du mélange est rigoureusement proportionnel à la quantité d'Hp qui lui est ajoutée.

Ce qui permet le dosage de l'Hp c'est la mesure :

1 - soit de la quantité de substrat oxydé dans un temps déterminé (pouvoir "activant" du plasma)

2 - soit la quantité d'Hp nécessaire à la saturation d'une quantité connue d'Hb.

TECHNIQUES DE JAYLE : (8)

1 - Matériel :

a) Haptoglobinomètre :

- bain-marie portant, dans deux rangées de cinq orifices, des creusets de porcelaine et, dans deux orifices de plus grand diamètre, un bécher de 500 ml destiné à la solution tampon, un bécher de 250 ml destiné à la solution d'iodure de potassium

- cinq agitateurs rotatifs plongeant dans les creusets,

- une burette pouvant remplir chaque creuset de la rangée postérieure,

- une lampe pour l'éclairage sous-jacent des creusets.

b) un jeu de pipettes de précision de 0,2 ml

c) un chronomètre de précision.

2 - Réactifs :

a) solution d'Hb M/20.000 en Fe hématique préparée extemporanément à partir d'Hb cristallisée de Cheval, sous toluène (dont l'activité peroxydasique est superieure à celle de l'Hb humaine) ; le dosage du Fe Hématique est fondé sur l'oxydation de l'acide iodhydrique par le sulfate ferrique.

b) solution d'hydroperoxyde d'éthyle N/10 préparée à partir d'une solution mere titrée iodométriquement chaque mois par l'hyposulfite de soude.

c) solution tamponnée à pH 4,4 d'acétate de sodium
acide acétique N/10
acétate de sodium N/10

d) solution d'iodure de potassium N/10

e) solution fraîche d'hyposulfite de soude N/100

f) empois d'amidon

g) solution titrée d'iode N/100

h) sérum ou plasma à examiner non hémolysé.

3 - Dosage proprement dit :

- 0,1 ml de la solution d'Hb est introduit dans la serie postérieure des creusets de l'haptoglobinomètre chauffe à 32°.

- 0,05 ml de sérum (dilué au 1/2) est introduit dans les quatre premiers.
On mélange et on se réserve le 5e creuset comme témoin.

- 1 ml de peroxyde N/10 dans chaque creuset de la série antérieure ;

- 10 ml de la solution d'acétate tamponnée à pH 4,4 dans chaque creuset de la série antérieure

- 3 ml de la solution d'iodure dans la série postérieure,

- 0,5 ml d'iode N/100 dans chaque creuset de la serie antérieure.

On procède alors au mélange en versant chaque contenu de la capsule antérieure dans chacun des creusets correspondants de la série postérieure.

Le chronomètre est déclenché lors du mélange, de façon que les mélanges soient faits respectivement aux temps de : 1 minute pour le n°2 et 4 minutes pour le n°5.

A 4 mn 15 sec., 2 gouttes d'empois d'amidon sont versées dans la capsule I ;

A 4 mn 30 sec. la titration commence ;

A 5 mn la titration doit être achevée.

Le temps doit être rigoureusement répété pour chacune des capsules de manière que l'ensemble des opérations soit terminé à la neuvième minute.

Les récipients de porcelaine doivent être convenablement éclairés pour pouvoir apprécier le degré de virage avec précision.

En outre, pour des résultats necessitant un volume d'hyposulfite supérieur à 1,7 ml, les sérums examines devront être dilués au 1/3, au 1/4, ou plus.

Les résultats sont exprimés en "indice d'haptoglobine" (voir ci-dessous) apres soustraction de l'iode dégagé par le temoin (n°5) sur 0,05 ml de sérum en tenant compte du coefficient de dilution.

A - Technique de saturation de M.F. JAYLE :

Si, à une quantité fixe d'Hb, on ajoute des quantités croissantes d'Hp, on constate que l'activité peroxydasique du mélange est proportionnelle à l'Hp. Inversement, si, à une quantité fixe d'Hp, on ajoute des quantités croissantes d'Hb, on constate que l'activité peroxydasique du mélange est proportionnelle à l'Hb. JAYLE en déduit que l'Hb et l'Hp doivent s'unir molécule à molécule pour former le complexe Hb-Hp.

Plus précisément, une molécule-gramme d'Hp (P.M. = 90.000) s'unit à une molécule-gramme d'Hb (P.M. = 68.000).

La technique de saturation consiste à déterminer le volume de sérum dont l'Hp sature 0,1 ml d'une solution d'Hb M/80.000 soit M/20.000 en fer.

La quantité d'Hb de 0,1 ml mesurée avec une très grande précision est introduite dans chaque capsule postérieure et des quantités croissantes de sérum sont ensuite introduites dans chacun des creusets 1, 2, 3 et 4 ; pur, si l'indice est inférieur à 1 par la méthode d'activation. Mais un indice supérieur à 1,5 est préférable car les causes d'erreur sont moindres avec une dilution. Ainsi sont introduits successivement par exemple 0,05 , 0,10 , 0,15 ml etc ... et l'opération est conduite comme decrit plus haut.

On retranche des résultats celui fourni par le témoin et on peut constater que la quantité d'iode dégagée dans les creusets est bien fonction de la quantité de sérum introduite pour devenir ensuite constante malgré les quantités croissantes de sérum ; la saturation a été obtenue par ce procédé selon la courbe ci-dessous.

Il est ainsi aisé de déterminer la quantité de sérum pur nécessaire à la saturation de la prise d'essai d'Hb M/20.000 ; et d'en déduire la concentration molaire du sérum en Hp.

Indice d'Hp :

L'indice d'Hp est le rapport, par definition de

$$\frac{\text{concentration du sérum en Hp}}{\text{concentration de la solution Hb}} = \frac{C2}{C1}$$

Quand la quantité d'Hb contenue dans 0,1 ml mise en présence de l'Hp du sérum est saturée par un volume VS de celui-ci, on peut écrire :

$$\frac{C2 \times VS}{Hp} = \frac{0,1 \times C1}{Hb}$$

et on a : $$\frac{C2}{C1} = \frac{0,1}{VS}$$

C1 étant fixe, l'indice d'Hp est fonction directe de la teneur du sérum en Hp.

Si on pose :

VH = volume d'hyposulfite pour obtenir le virage et correspondant à la quantité d'iode

libérée par la réaction pendant les cinq premières minutes.

VT = Volume d'hyposulfite avec Hb seule.

La valeur témoin représente :

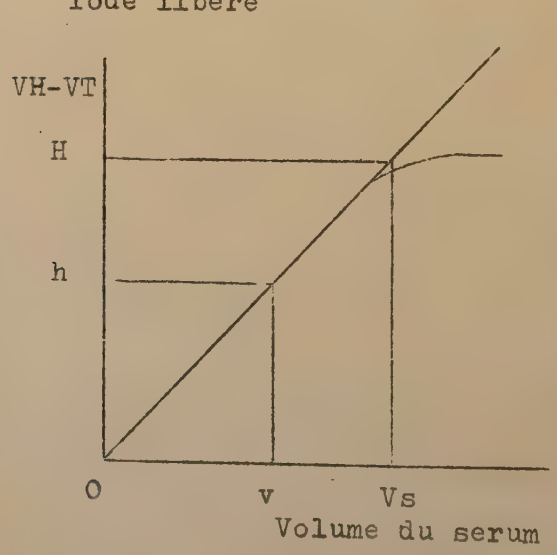
1 - l'excès d'iode mis au debut pour inhiber l'Hb.

2 - l'iode libéré par l'Hb libre

3 - l'iode libéré par le peroxyde sur l'iodure de potassium.

Si on porte en ordonnée les valeurs VH-VT correspondant à différents volumes VS de sérum (en abscisse), nous obtenons :

Figure 1



D'après la figure, pour des valeurs de VS inférieures à X, la quantité d'iode liberée est proportionnelle à VS.

Pour des valeurs de VS supérieures à X, elle reste constante et égale à VH-VT = H

Le volume X de sérum est celui qui contient exactement la quantité d'Hp nécessaire et suffisante pour saturer l'Hb contenue dans la prise initiale de 0,1 ml.

Mais la titration par cette méthode dite de "saturation" est longue et délicate, c'est pourquoi une seconde metnode dite d'"activation" fut mise au point par JAYLE.

B - La méthode d'activation :

peut être énoncée comme suit :

Soit X le volume de sérum qui sature exactement 0,1 ml de solution d'Hb $1,25 \cdot 10^{-5}$ M :

on a : $C2 \times X = 0,1 \times 1,25 \cdot 10^{-5}$

Comme $i = \frac{C2}{C1} = \frac{0,1}{VS}$, l'indice d'Hp de ce sérum est égal à $\frac{0,1}{X}$

Soit h et H les volumes d'hyposulfite correspondant aux quantités d'iode liberé par les volumes x et X de serum ; d'après l'égalité des triangles rectangles :

$$\frac{x}{X} = \frac{h}{H} \qquad \text{ou} \qquad X = x \cdot \frac{H}{h}$$

Puisque H est constant, il suffit donc d'un seul dosage avec une prise d'essai x de sérum pour connaître X.

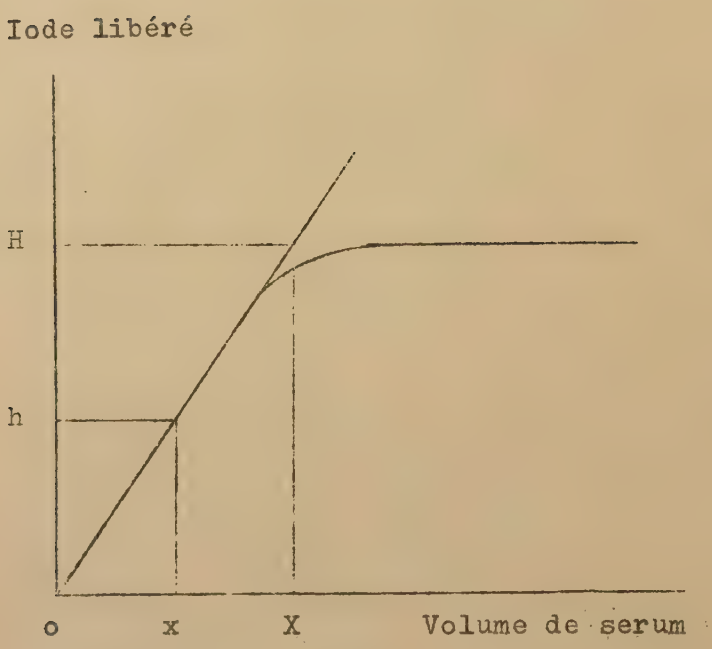


Figure 2

C'est le principe de la méthode d'activation nécessitant un chronométrage rigoureux.

C'est une titrimétrie.

METHODE CINETIQUE DE SMITHIES (3) :

1 - Principe : c'est une méthode utilisant comme JAYLE l'activité peroxydasique du complexe Hb-Hp. L'oxygène libéré dans la réaction peroxydasique à partir de peroxyde d'hydrogène, oxyde le gaïacol dont l'intensité de coloration est appréciée au spectrophotomètre à 470 m μ, à 30°, dans un temps déterminé.

2 - Réactifs :

a) eau oxygénée : solution 0,600 $\pm$ 0,005 M fraîche à partir d'une solution stock titrée régulièrement au permanganate de potassium

b) gaïacol : solution acéto-acétique 0,03 $\pm$ 0,001 M à pH 4

c) methémoglobine humaine : titrant $5 . 10^{-5}$ en fer hématique conservée à -20° (obtenue par transformation d'oxyhémoglobine sous l'action du ferricyanure de potassium).

3 - Appareillage : Nécessite avant tout un spectrophotomètre dont le bain est maintenu à une température constante de 30°.

4 - Dosage proprement dit :

- Ces trois réactifs sont placés au bain-marie à 30°.

- Le sérum est dilué au 1/5e et mis en présence d'un égal volume de methemoglobine.

- Sont placés dans la cuve spectrophotométrique :

1/ 0,2 ml du mélange
2/ 2,75 ml de gaïacol
3/ 0,05 ml d'eau oxygénée

- Le temps est alors compté à partir de cet instant.

- La densité optique est enregistrée simultanément à 470 m µ.

- Ces valeurs sont portées par rapport à des axes de coordonnées :

temps en abscisse
densités optiques en ordonnée

Les courbes ainsi obtenues présentent trois parties : (fig.3)

inflexion initiale
partie ascendante rectiligne
plateau terminal

La vitesse de réaction est fonction de la pente et proportionnelle à la concentration en Hp du sérum à examiner.

TECHNIQUE D'OWEN

1 - Réactifs :

a) Gaïacol :

- 3,70 g de gaïacol sont mélangés à 700 ml d'eau distillée.

- 100 ml d'acide acétique N = 1 y sont ajoutés

- on ajuste à pH 4 par de la soude N = 1

- on complète à 1000 ml par de l'eau distillée.

b) peroxyde d'hydrogène : on le prépare extemporanément

- 0,05 M à partir d'une solution standard do-

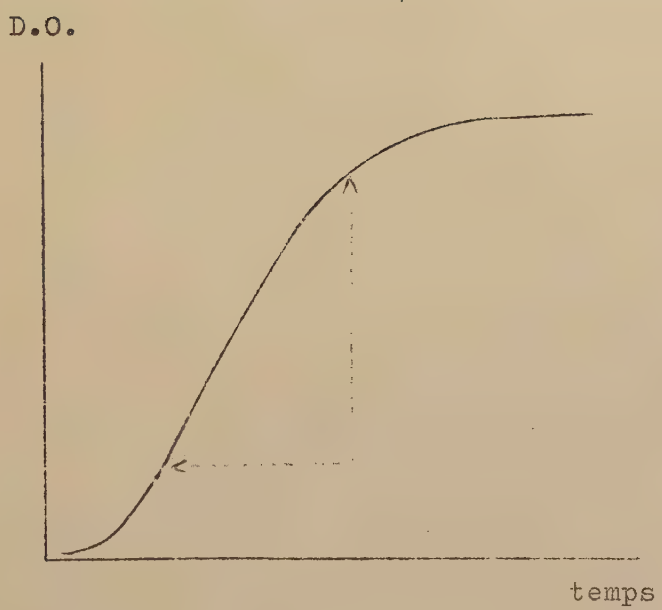


Figure 3

Schéma de la cinétique de la réaction entre le complexe Hb-Hp et l'eau oxygénée en présence de gaïacol

(Entre les flèches la zone utilisée par Smithies)

sée elle-même préalablement par une solution standard de permanganate de potassium.

- ou 0,15 M (soit 0,5 ml d'eau oxygénée à 30 p.cent pour 100 ml d'eau.

c) méthémoglobine : à huit volumes d'érythrocytes humains lavés trois fois, ajouter trois volumes d'eau et un volume d'ether

- agiter, centrifuger, décanter la solution d'Hb
- en déterminer la teneur et la ramener à 1 g p.cent
- à 25 ml de cette solution, ajouter 10 ml de solution de ferricyanure de potassium (100 mg/100 ml)
- après 10 minutes ajuster à 500 ml (peut être conservée plusieurs semaines au réfrigérateur)
- l'Hb titrée de Hyland peut être aussi utilisée.

2 - Technique

- un volume de sérum est dilué avec 4 volumes de chlorure de sodium à 1 ml

- à chaque partie des sérums dilués sont ajoutés respectivement
  1 ml de solution de méthémoglobine
  et 1 ml d'eau oxygénée

- deux tubes tests chacun avec la solution de gaïacol sont mis dans un bain-marie à 25°

- apres 10 minutes, 0,1 ml du mélange sérum-métHb est ajouté.

- on fait de même avec un mélange sérum-eau (blanc)

- immédiatement après cette opération, 1 ml d'eau est ajouté

- après 8 minutes, on procède à la lecture photométrique à 470 m μ. Elle doit être terminée dans les quatre minutes.

- Courbe étalon :

Dans 11 tubes, on introduit 1 ml de la solution de métHb et on ajoute des quantités croissantes d'un pool de sérums normaux (1) non hémolysés. On complète à 2 ml.
On traite cette gamme comme ci-dessus et on obtient une courbe de ce type (Fig. 4 a).

TECHNIQUE DE NYMAN (24) :

Méthode de dosage par électrophorèse sur papier.

1 - Principe :

Elle utilise la propriété de l'Hp de s'unir molécule à molécule à l'Hb en formant un complexe dont le pH est égal à 4,85 tandis que celui de l'Hb est de 6,9. Une simple électrophorèse sur papier permet donc de séparer les deux composés.

A pH 7, l'Hb non combinée demeure sur la ligne de départ où elle est mise en évidence par une coloration appropriée.

---

(1) Comme nous l'avons déjà signalé plus haut, ce pool est supposé composé de sérums normaux d'indice d'Hp égal à I (ce qui est très contestable)

2 - Appareils et réactifs

a) cuve à électrophorèse (par exemple JOUAN, modèle CNRS)

b) papier Arches 304. Dimensions : 40 x 28 cm

c) tampon phosphate mono-et disodique 0,01 M de pH 7 ± 0,1

d) solution stock d'Hb de Cheval titrée en Fe

e) solution méthylique d'acétate de benzine ou éthylique d'acétate de O-dianisidine

100 mg O-dianisidine
70 ml d'éthanol
10 ml 1,5 m tampon acétate pH 4,7
18 ml d'eau distillée
2 ml d'eau oxygénée à 30 p.cent.

f) eau oxygénée 0,06 p.cent préparée extemporanément par dilution d'une solution stock 20 N type "Electro".

3 - Mode opératoire

Sur une feuille de 28 x 40 cm, on trace, sur une ligne parallèle au petit axe, à deux cm de celui-ci, huit traits de 1,5 cm de longueur, séparés entre eux par la même distance : ces traits constituent les lignes de dépôt.

La feuille de papier, d'abord imbibée de tampon, est doucement essorée entre deux feuilles de papier filtre ; elle est alors placée dans l'appareil à électrophorèse, puis laissée au repos pendant 30 minutes, de façon à équilibrer le papier avec la phase liquide.

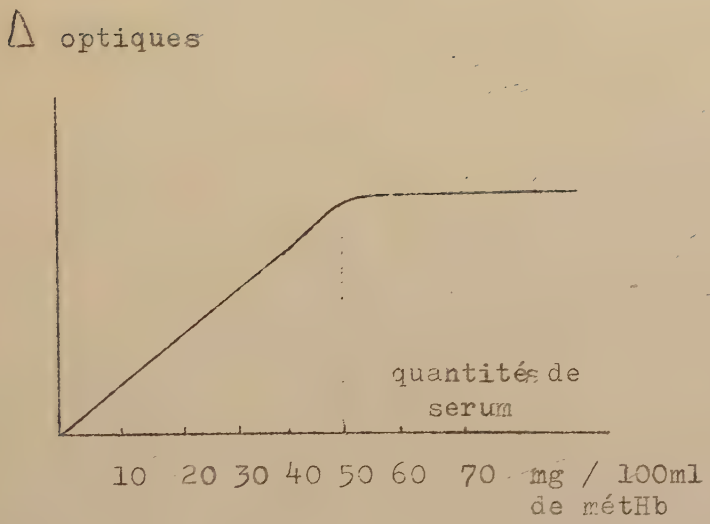

Δ optiques
quantités de serum
10 20 30 40 50 60 70 mg / 100ml de métHb

Figure 4 a

Constitution d'une gamme d'Hb :

Par dilution d'une solution mère d'Hb, on prépare une solution M/1000 en Fe dont on se servira pour constituer la gamme étalon d'Hb.

On sait que :

0,01 ml d'Hb M/20.000 sature complètement 0,01 ml d'une solution de Hp contenant 1,3 g/l. Il est alors facile de constituer par dilution une gamme d'Hb.

Cette gamme est préparée tous les jours et placée à 4° dans les tubes à hémolyse.

De chaque tube de la gamme ainsi constituée on prélève 0,01 ml d'Hb que l'on mélange dans un verre de montre à 0,1 ml de sérum à tester. On obtient de la sorte une série de solutions contenant une quantité fixe d'Hp et des quantités croissantes d'Hb. On dépose 7 à 10 microlitres du melange contenu dans chaque récipient sur la ligne de dépôt correspondante.

On soumet l'ensemble à une électrophorèse de 15 heures sous 125 volts. La feuille est ensuite séchée à l'étuve à 100° pendant 15 minutes, plongée dans la solution de O-dianisidine préparée extemporanément, rincée à l'eau et séchée à la temperature de la pièce, entre deux feuilles de papier filtre.

Les régions contenant de l'Hb ou du complexe apparaissent sous forme de taches colorées.

Dans la méthode originale de M. NYMAN, la gamme d'Hb s'exprime en mg par ml et les con-

centrations d'Hp en Hb. B.C. (cf. p.42)

4 - Interprétation des résultats

La lecture des résultats doit se faire sur la feuille encore humide, car la benzidine se décompose à la lumière. On recherche la première ligne de dépôt sur laquelle subsiste de l'Hb en excès, c'est -à-dire non combinée à l'Hp du sérum. L'indice de sérum recherché se situe donc entre la valeur pour laquelle on voit apparaître pour la première fois Hb en excès et celle qui la précède immédiatement.

-:-

EXPRESSION DES RESULTATS

UNITES

-:-

I - Indice d'haptoglobine

Dans la méthode de saturation de JAYLE, on procède à la détermination (cf. ci-dessus) du volume VS de sérum ou de solution d'Hp qui sature exactement l'Hb contenue dans 0,1 ml d'une solution M/80.000.

On peut alors écrire :

VS concentration du sérum en Hp = 0,1 x M/80.000

ou encore :

$$\frac{\text{concentration en Hp}}{\text{concentration en Hb}} = \frac{0,1}{VS} = i \qquad (1)$$

Il est donc possible, connaissant VS, de déterminer la concentration en Hp du sérum dosé. Pour en simplifier l'expression, M.F. JAYLE a introduit la notion d'indice ou index d'Hp.

Par définition, l'unité d'index d'Hp est celui d'un sérum qui sature volume à volume une solution d'Hb M/80.000. Comme le montre l'équation ci-dessus (I), cet index est un rapport : il exprime combien de fois le sé-

---

(1) voir ci-dessus "Indice d'Haptoglobine"

rum est plus (ou moins) concentré en Hp que l'est, en Hb, une solution de référence. Il fait abstraction du poids moléculaire des deux protéines ; il ne tient compte que d'un fait : leur union molécule à molecule.

2 - Hb. B.C. = Hemoglobin Binding Capacity :

NYMAN a introduit une autre manière d'exprimer les quantités d'Hp, adaptée à sa méthode électrophorétique de dosage.

L'expression Hb.B.C. represente la quantité d'Hb en mg qui peut être liée à l'Hp présente dans 100 ml de solution à titrer.

Il est aisé de passer de l'indice i de JAYLE à l'Hb.B.C. de NYMAN ; une solution M/80.000 d'Hb contient 82,5 mg d'Hb dans 100 ml. Il suffit donc de multiplier par ce chiffre l'indice i de JAYLE.

3 - Expression en grammes par litre

Les deux manières précédentes d'exprimer la teneur d'un liquide en Hp pouvaient se justifier lorsqu'on ignorait le poids moléculaire de l'Hp et son mode d'union à Hb. Il est actuellement établi que l'Hp I-I a un poids moléculaire de 90.000 à 10 p.cent près et que sur 1 mg d'Hb se fixe 1,3 $\pm$ 0,1 mg d'Hp, selon la réaction équimoléculaire Hb + Hp = Hb-Hp.

En outre, la combinaison entre les Hp 2-I et Hp 2-2 se fait dans le même rapport pondéral I/I,3.

En conséquence, il est rationnel de substituer aux conventions précédentes le taux de

l'Hp en grammes pour 1.000. A cet effet, il suffit de multiplier par I,I l'index d'Hp tel qu'il est donne par la méthode de JAYLE et par 0,013 la valeur exprimée en termes de Hb.B.C.

-:-

- II -

AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE CES DIFFERENTES METHODES (1)

-:-

I - La méthode de saturation de JAYLE demeure la méthode de référence. Très précise, elle est néanmoins longue, ce qui la rend inutilisable en série.

2 - La méthode d'activation :

est demeurée jusqu'ici la plus courante et la plus pratique, d'autant qu'elle est plus rapide que la précedente. Quoique moins précise, elle donne des valeurs largement suffisantes pour un usage clinique ; mais elle nécessite de la part de l'expérimentateur des qualités qu'il est peut être difficile d'obtenir de la part de manipulateurs d'un laboratoire courant à faible débit.

3 - La méthode électrophorétique de NYMAN :

Quoique simple du fait qu'elle n'exige qu'un matériel élémentaire et un personnel peu spécialisé, elle est très longue (cf. description technique ci-dessus).

Pour des résultats non supérieurs à ceux donnés par la méthode d'activation de JAYLE, elle ne permet guère une application de pratique courante.

---

(1) Ils ont fait l'objet d'une étude détaillée dans la thèse de WAKS (31).

4 - La méthode de SMITHIES :

présente de nombreuses qualités séduisantes ; par sa précision et sa sensibilité, elle a sa place dans les méthodes de recherche, tout près de la technique de saturation de JAYLE.

Mais elle nécessite un appareillage complexe (spectrophotomètre enregistreur) ; la température doit être fixe ; par contre, les temps de réaction sont facilement observés puisque de manière automatique.

Si l'instabilité de l'eau oxygénée pouvait par ailleurs être évitée, sa simplification la rendrait séduisante comme technique de dosage de routine.

5 - La technique d'OWEN :

Elle est simple : automatisée, elle semblerait pouvoir présenter les avantages recherchés et éliminer la plupart des inconvénients à éviter.

L'automatisme qui permet de respecter rigoureusement les temps au cours de la réaction, nous dispense même de nous placer dans les conditions qu'OWEN avait choisies pour le mettre à l'abri des erreurs (Choix d'une cinétique lente traduite par une courbe étalée) (fig.4 b).

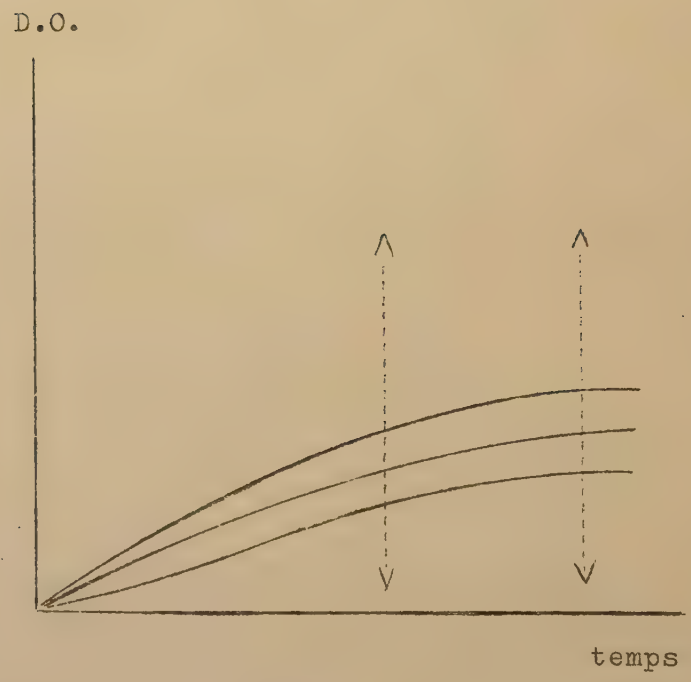


Figure 4 b

Owen utilise une cinétique plus lente.

Il se place dans la zone où la pente est la plus douce

Mais la plus grosse critique que l'on peut adresser à la technique originale d'OWEN est l'utilisation, pour l'étalonnage, d'un pool de sérums supposés normaux, postulant que leur valeur est rigoureusement égale à 1 ; (or, certains serums normaux ont une valeur inferieure à 1).

-:-

- III -

LA METHODE AUTOMATIQUE

-:-

Etant donné les difficultés que présentent les méthodes manuelles, il nous a semblé intéressant d'employer une méthode automatique joignant à la simplicité de la méthode d'OWEN, les avantages de l'automatisme où le temps est toujours le même pour chaque dosage. Nous avons donc utilisé l'appareil "autoanalyseur" de la Cie Technicon dont nous rappelons ici brièvement les principes généraux : (27-28)

- Une pompe dite "proportionnante" pousse simultanément à travers des tubes en matière plastique (polyvinyl) les réactifs et échantillons, créant ainsi des flux de liquides qui se mélangent dans des proportions qui sont sous la seule dépendance du calibre de chaque tube de pompage.

- Le mélange de ces flux, pour être correct, doit être segmenté par des bulles d'air pompées également par des tubes de diamètre déterminé. Ces bulles d'air ont l'avantage de nettoyer les tubulures et de fragmenter en différentes parties aliquotes les mélanges de réactifs. Ainsi on obtient, dans chaque fraction, un melange plus homogène : aucune diffusion n'est possible entre chaque petit segment liquide.

- Les flux mélangés pourront ensuite passer dans des bains-marie, dans des bobines de mélanges, dans des dialyseurs qui effectueront les diverses opérations de la chimie courante.

- En fin d'opération, un appareil de mesures physiques :

soit un colorimètre si l'on lit une réaction colorée,
soit un pH mètre si l'on lit une variation de pH,
soit n'importe quel appareil physique, mesure les variations physiques (intensité de coloration, pH, conductivité etc...) du flux final composé de tous les éléments de la réaction à un stade précis ; ces variations se traduiront par une courbe sur un enregistreur automatique.

- Dans le cas le plus fréquent, qui est celui de la colorimétrie, le flux passe d'une façon continue dans une cuvette. A travers celle-ci les variations d'intensité de coloration sont enregistrées à une longueur d'onde définie. Cette opération est effectuée par un colorimètre qui traduit les variations électriques. En définitive, on obtiendra une courbe en dôme dont le sommet correspond au maximum d'intensité de coloration pour chaque échantillon, chacun d'eux etant pompé l'un après l'autre pendant des temps determinés et rigoureusement identiques.

L'avantage d'un tel appareil dans le cas de l'Hp, réside précisément dans la rigoureuse constance des temps de réactions.

En effet, la réaction peroxydasique, comme toute réaction enzymatique, est une réaction

possédant sa cinétique propre (28). Il est donc très important que les temps de chaque opération (mélanges, séjours en bains-marie) soient rigoureusement identiques. Il y avait là, dans les opérations manuelles pour la détermination des quantités d'Hp, une difficulté qui n'existe pas avec l'appareil automatique. Les bains-marie peuvent être réglés avec une précision de l'ordre du dixième de degré, ce qui assure ainsi une constance de température indispensable (celle que nous avons choisie dans le cas qui nous intéresse est de 37° pour des raisons que nous énonçons plus loin).

Ces avantages nous ont incités à utiliser cet appareil pour le dosage de l'Hp. Mais nous nous sommes heurtés, au début de nos essais, à d'autres difficultés qui n'existent pas dans les méthodes manuelles, et que nous avons dû résoudre.

Pour ne pas compliquer le problème dès l'abord, nous avons commencé par préparer les complexes Hp-métHb manuellement, nous contentant de rendre automatique la réaction colorée obtenue dans la méthode d'OWEN par l'action du gaïacol sur l'eau oxygénée décomposée par le complexe peroxydasique.

Il sera certainement possible de rendre entièrement automatique la méthode, en pompant, non plus des complexes préparés manuellement, mais les divers échantillons de sérums qui seront mélangés à la métHb ou à l'Hb ; mais, dans l'état actuel de nos essais, nous avons considéré ce problème simple comme accessoire, désirant surtout mettre au point les conditions optimales de la réaction colorée.

Dès le début de nos essais, nous avons commencé par suivre rigoureusement la technique d'OWEN ci-dessus décrite ; rapidement, nous nous sommes aperçus que, pour son application automatique, cette technique devait être modifiée :

- tout d'abord, le délai de réaction de 8 minutes choisi par OWEN, pouvait être diminué, puisque l'exactitude du temps est certaine avec l'appareil automatique ; le choix de ce temps, pour une opération manuelle, comme le montrent les courbes schématiques ci-dessous, permet de se placer dans les conditions les meilleures : on se trouve au moment où la pente est la moins forte donc avec le moindre risque quant à la non observation rigoureuse du temps.

- ensuite, nous avons été amenés à changer la concentration du gaïacol lorsque nous nous sommes aperçus que, lorsque le gaïacol est trop concentré, il peut se former un dépôt dans la cuvette de mesure et un manque d'homogénéité au sein du liquide qui peuvent créer quelques parasites sur les courbes.

- enfin, nous avons été amenés, en fin de réaction, à enlever les bulles d'air que nous avons vues plus haut être indispensables au moment du melange des réactifs : les bulles d'air provoquaient en effet, comme chaque fois que l'on a affaire à une solution proteique, de la mousse à l'arrivee dans la cuvette. Cette mousse laissait passer de minuscules bulles d'air dans la partie optique de la cuvette de mesure, ce qui perturbait l'allure des courbes. A la sortie du bain-marie à 37°, il n'y a plus d'inconvénient à enlever ces bulles ; et ceci est très facile à

réaliser grâce à ce qu'on appelle un "T débulleur" relié à un tube de pompe qui aspire l'air au moment où le flux passe dans la branche horizontale du T ; le calibre du tube d'aspiration est choisi de telle sorte qu'il aspire l'air et une petite quantité constante du flux liquide.

On peut aussi, comme nous l'avons fait ultérieurement, au lieu de pomper les bulles d'air, faire l'inverse, c'est-à-dire, à travers le T débulleur, repomper le liquide avec des tubes de diamètres tels qu'ils ne pompent que le liquide, l'air s'évacuant à l'extérieur.

En définitive, nous avons adopté le montage ci-après :

(figure 5)

Ces montages conduisent à des courbes très régulières dont nous donnons ci-dessous un exemple : fig.6

Le complexe pompé par un tube dont le débit est de 0,80 ml par minute, est melangé à l'hydroperoxyde d'éthyle ou l'eau oxygénée (1,20 ml par minute) qui est "bullé" par une colonne d'air dont le débit est de 1,60 ml par minute. Immédiatement apres, le melange est additionné de gaïacol sous un debit de 3,90 ml par minute ; puis le tout passe à travers une spirale en colonne mélangeuse qui est à une température constante de 37° et qui crée un délai de 45 secondes environ. Le liquide est repompé après elimination des bulles d'air et envoyé dans la cuve à circu-

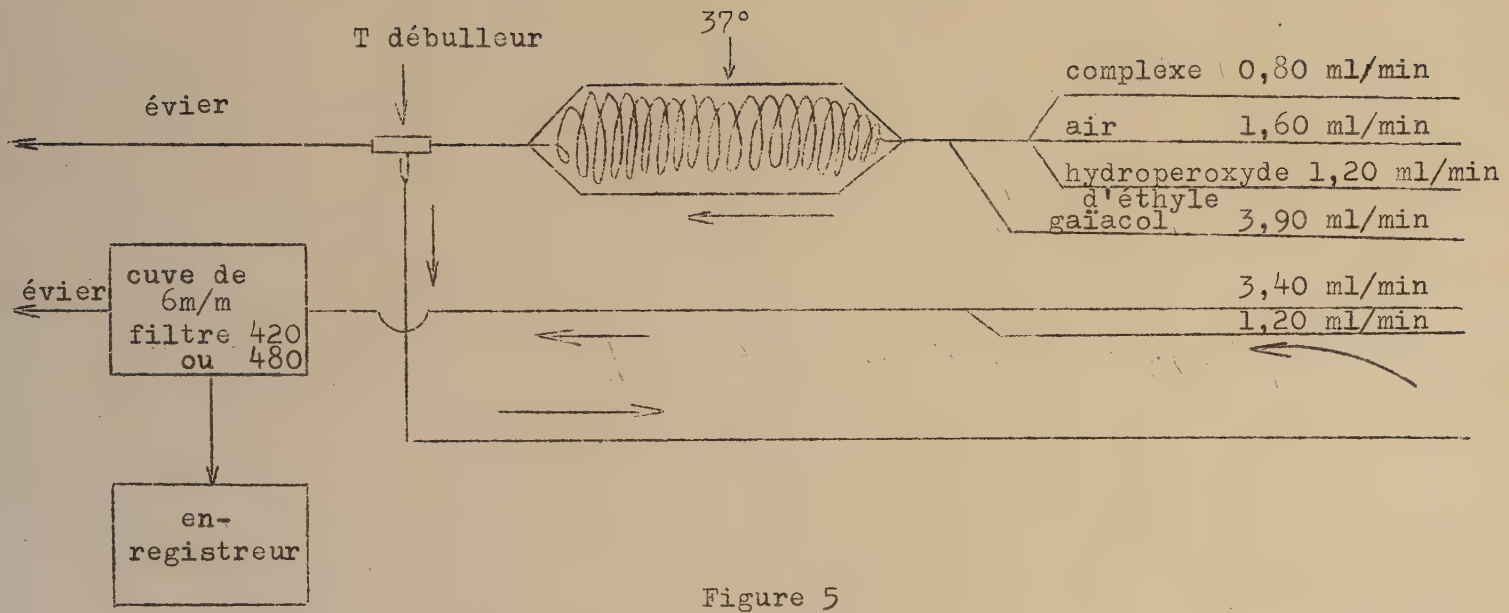
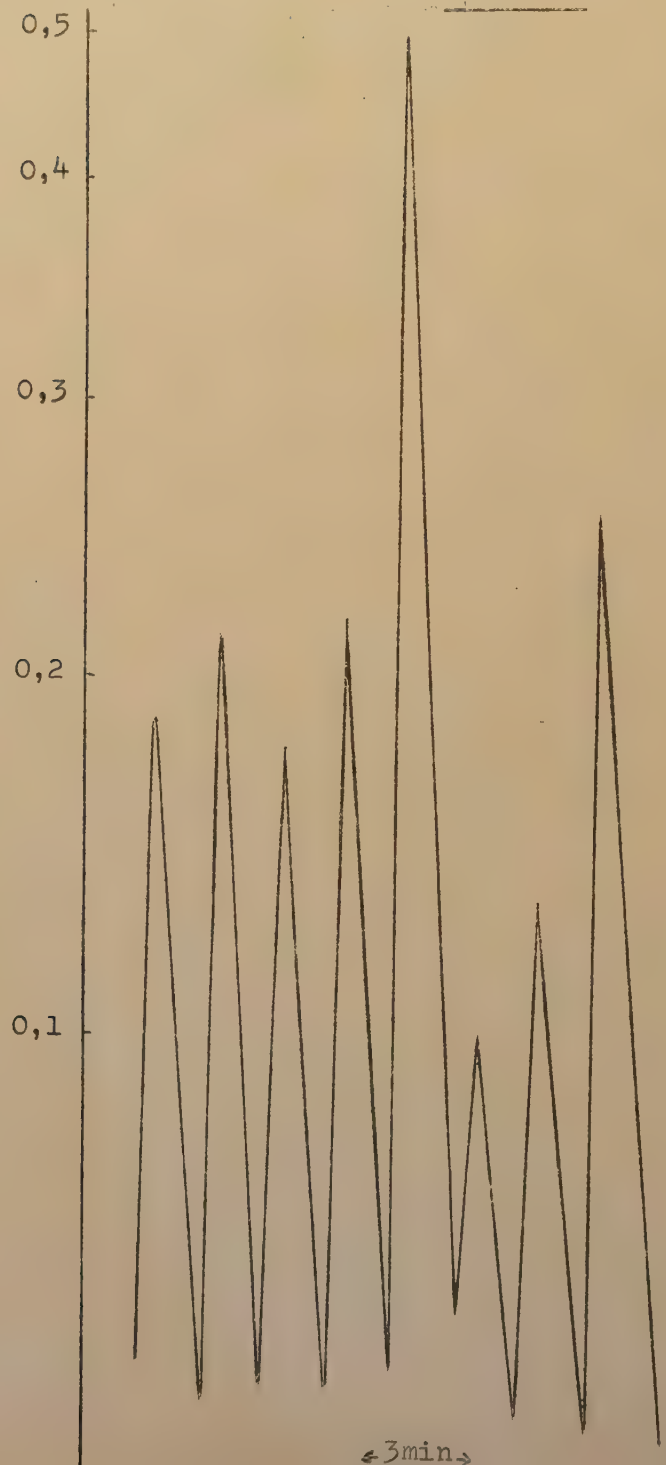

T débulleur
37°
évier
complexe 0,80 ml/min
air 1,60 ml/min
hydroperoxyde d'éthyle 1,20 ml/min
gaïacol 3,90 ml/min
évier
cuve de 6m/m filtre 420 ou 480
3,40 ml/min
1,20 ml/min
en-registreur

Figure 5

Figure 6



lation du photomètre sous une longueur d'onde de 480 mμ

LES REACTIFS

I - Le réactif au gaïacol

Nous utilisons le réactif d'Owen dont la formule a eté donnée plus haut, en le diluant d'abord avec un volume égal de tampon acétate-acétique, puis au dixième avec de l'eau physiologique.

L'influence de l'isotonicité du gaïacol nous a été montrée par les expériences suivantes :

les expériences A et B ont été conduites dans des conditions rigoureusement identiques, avec

les mêmes réactifs
les mêmes montages
les mêmes temperatures

avec cette différence qu'en B il a été ajouté 9 g/l de Cl Na ; on constate que les densités optiques de l'expérience B sont nettement inférieures aux densités optiques de l'expérience A.

Densité optique de la réaction au gaïacol

	A	B
Ier échantillon	0,036	0,022
2e "	0,116	0,070
3e "	0,263	0,184

L'augmentation de la densité optique avec le gaïacol non isotonique nous paraît attribuable à un très leger trouble non visible à l'oeil, dû à la precipitation des protéines à pH 3,9 ; il nous a semblé préférable d'éliminer cette variable.

Nous avons trouvé plus simple, dans la préparation du gaïacol à pH très constant, plutôt que d'ajuster à chaque opération au pH mètre, de mélanger la solution de gaïacol avec un tampon acétate-acétique assurant une stabilite à pH 3,6-3,9 . Nous avons ete amenés à mettre la solution de gaïacol en isotonie avec le serum par l'adjonction de 9 g/l de sel car sans cela à pH 4 la réaction présente, comme nous l'avons vu ci-dessus, un trouble perturbant la lecture photométrique.

II - Le peroxyde

Dans la méthode d'OWEN, le peroxyde utilisé est l'eau oxygénée ; nous nous sommes donc servis de ce produit tout au cours des premières expériences. Puis, nous devions nous apercevoir des inconvénients de l'eau oxygénée et nous avons été amenes à utiliser certains artifices pour y pallier. Ensuite, nous avons utilisé l'hydroperoxyde d'éthyle préparé suivant la méthode de JAYLE. Mais comme ce produit n'est pas facile à préparer, il était utile de comparer les résultats obtenus par l'hydroperoxyde d'éthyle et avec l'eau oxygénée, ce que nous avons fait. Les mêmes sérums ont été complexés d'une part avec de l'Hb M/40.000, d'autre part avec de la métHb M/40.000 ; chaque lot a été éprouvé à l'appareil d'une part avec de l'eau oxygénée, d'autre part avec l'hydroperoxyde d'éthyle M/200 ; nous avons obtenu les courbes suivantes qui montrent :

(fig. 7-8-9-10)

Figure 7

Complexes = Hb-H^2O^2

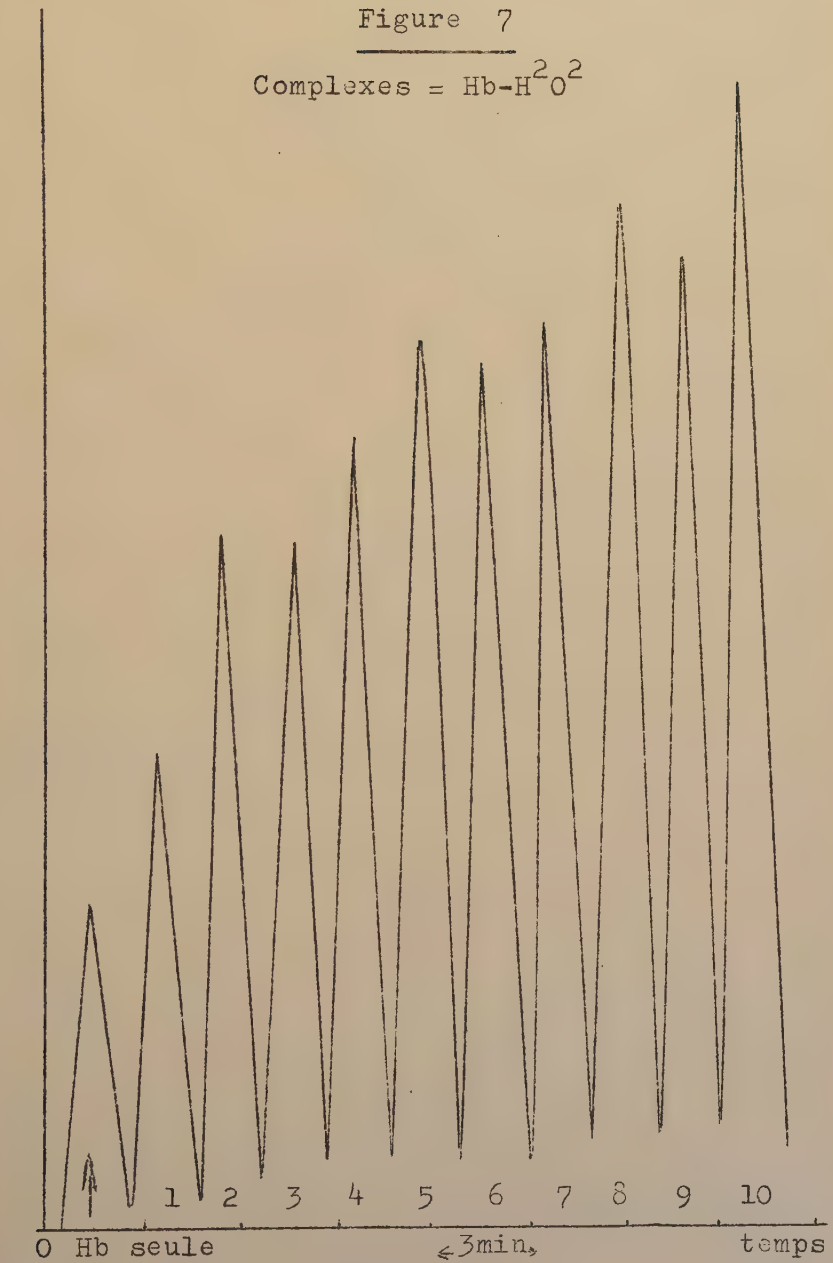


Figure 8

Complexes : mét Hb - H_2O_2

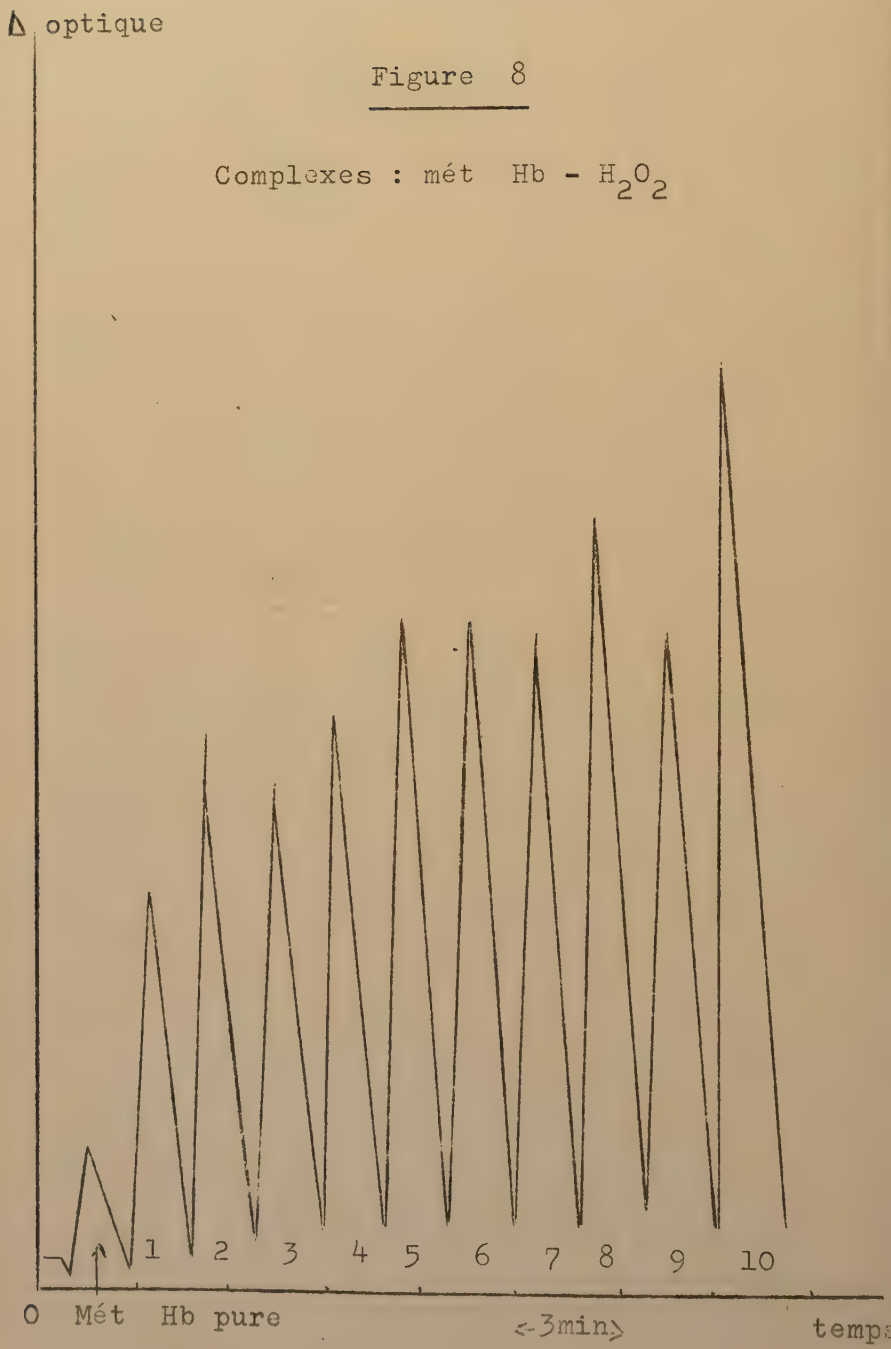
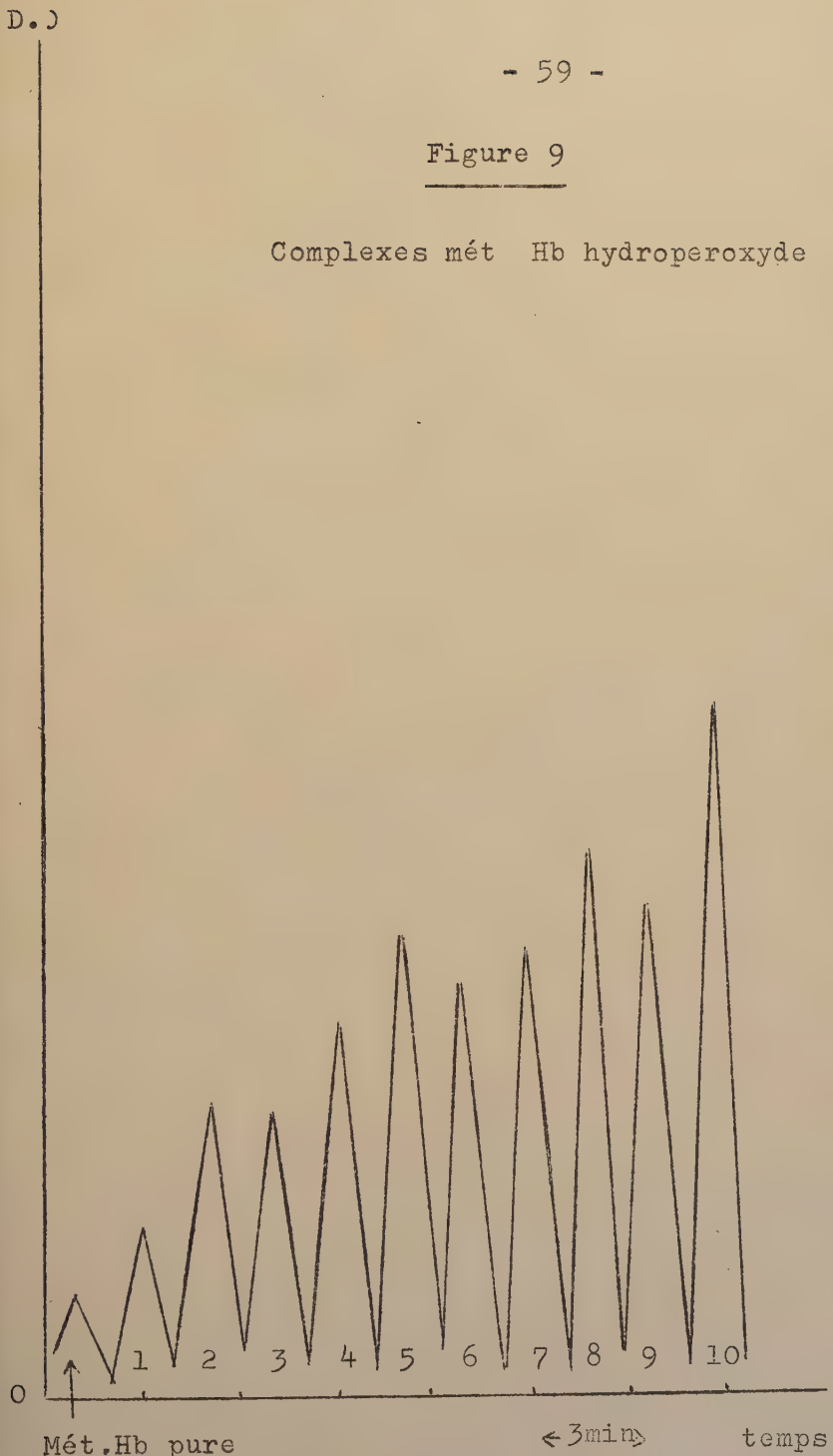


Figure 9

Complexes mét Hb hydroperoxyde



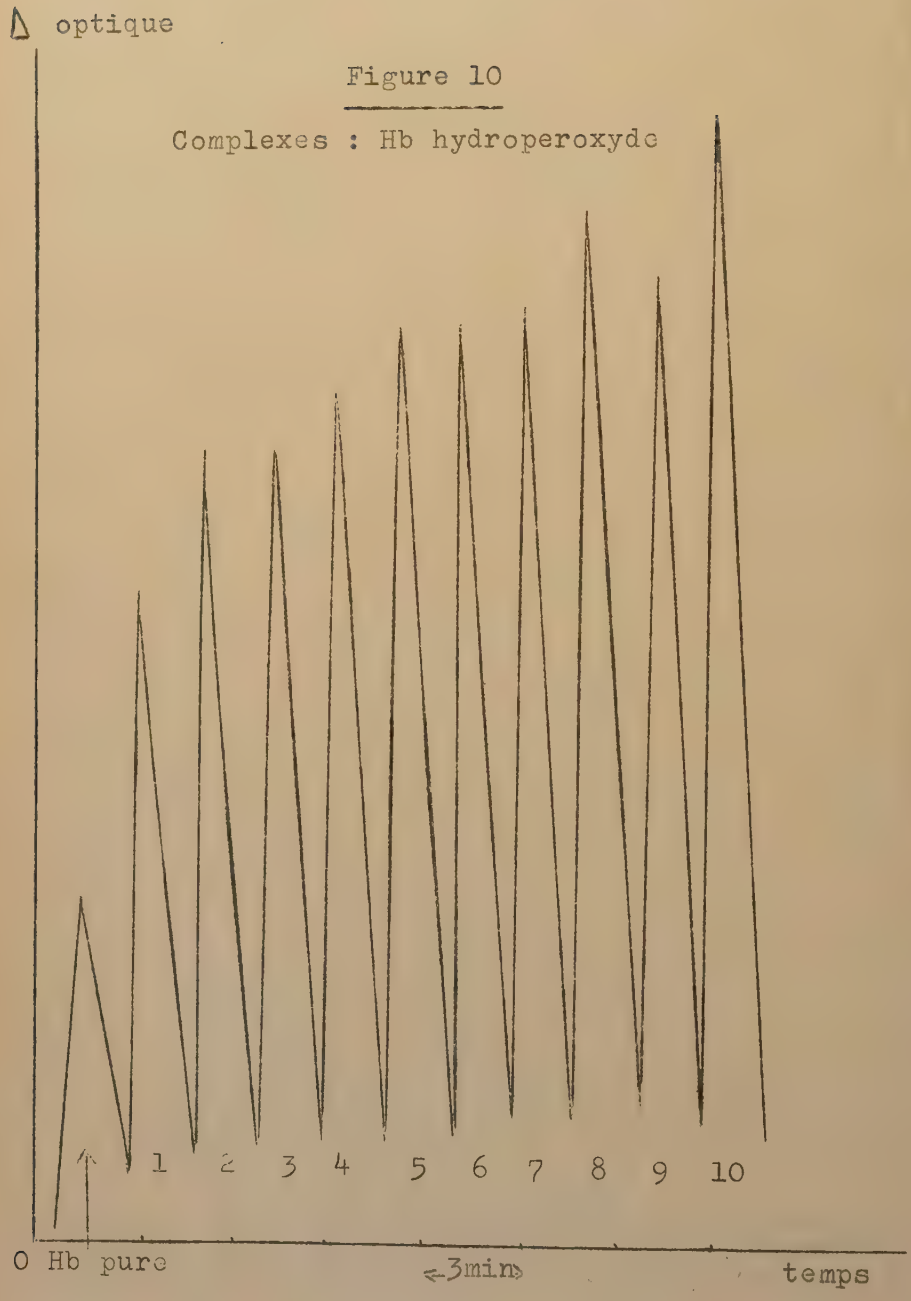

Δ optique
Complexes : Hb hydroperoxyde
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
0 Hb pure
<3min>
temps

Figure 10

Il résulte de ceci :

1/ que les valeurs comparatives des taux d'Hp obtenues avec les quatre méthodes sont comparables.

2/ que, lorsqu'on utilise la métHb, l'hydroperoxyde d'éthyle donne des courbes moins hautes, donc une sensibilité moins grande que l'eau oxygénée

3/ que, lorsque l'on utilise l'Hb de Cheval, la sensibilité est plus grande avec l'hydroperoxyde d'éthyle qu'avec l'eau oxygénée

4/ que le pouvoir peroxydasique propre de la métHb est moins élevé que le pouvoir peroxydasique propre de l'Hb.

On peut donc conclure que, lorsque l'on utilise l'Hb de Cheval et l'hydroperoxyde d'éthyle, on obtient le maximum de sensibilité de la réaction ; mais que, cependant, la diminution de sensibilité obtenue avec l'eau oxygénée n'est pas incompatible avec un résultat encore satisfaisant.

Par contre, lorsque l'on utilise la métHb, l'eau oxygénée est préférable à l'hydroperoxyde.

L'eau oxygénée est préparée extemporanément à partir d'une solution à 110 volumes (Eau oxygénée "Electro Prolabo") à une dilution de 1/2.000 ; nous avons remarqué que, si l'on ne prend pas de précautions, l'instabilité du réactif fait que des bulles d'oxygène peuvent se dégager dans le tube de pompage. Cet incident ne se produit cependant pas :

- si la dilution de la solution mère d'eau oxygénée est faite avec de l'eau contenant 1 g par litre d'E.D.T.A. (complexon III)

- si cette solution est mise dans un flacon en polythène au lieu d'un recipient en verre

- si, enfin, la température de la solution est aux environs de la température ambiante, sans grande variation.

Moyennant ces précautions, la dilution d'eau oxygénée est stable pendant sept à huit heures au moins.

III - Préparation manuelle des complexes

0,05 ml de sérum est mélangé à 1 ml de solution M/40.000 soit de métHb soit d'Hb de Cheval préparée suivant la methode de JAYLE.

Il est évident que les précautions habituelles de préparation du sérum doivent être prises :

absence d'hémolyse
absence de trouble

Si on observe un trouble ou une couleur prononcée du sérum non due à l'hemolyse, il est plus prudent de faire un blanc-serum en mettant la même quantité de sérum, 0,05 ml dans 1 ml d'eau physiologique.

Au début de nos expériences, nous ne faisions pas systématiquement pour tous les sérums un blanc-sérum, cette série devant être passée après les complexes. L'expérience ultérieure nous a appris que les différences venant de l'action peroxydasique propre des

sérums sont insignifiantes. En outre, lorsqu'il existe un trouble au sein du serum, celui-ci peut provoquer une très légère différence dans la hauteur du pic ; bien que ces facteurs ne conduisent pas à des erreurs considérables, il est donc préférable d'en tenir compte grâce à un blanc-sérum.

En cas d'hémolyse, il est impossible de faire un dosage correct.

IV - Reproductibilité

L'une des qualités primordiales requises par une méthode de dosage colorimétrique est sa reproductibilité. Ce fut donc un de nos premiers soucis de vérifier la reproductibilité de la méthode ; nous avons procédé de plusieurs manières et ceci à plusieurs reprises depuis deux ans :

1/ nous avons préparé un complexe qui fut pompé de façon non plus discontinue mais de façon continue ; dans ces conditions, si la réaction est stable, on ne doit pas avoir des clochers successifs, mais une ligne continue parallèle à la ligne de base puisque la densité optique de la réaction doit être constante.

C'est ce que nous avons observé en opérant ainsi un pompage continu ; pendant plus d'une heure nous n'avons observé, même avec l'eau oxygénée, qu'une déviation minime de l'aiguille de l'enregistreur correspondant à moins de 0,5 p.cent d'absorption.

2/ un même complexe a été réparti dans 20 godets différents pour voir si les pics obtenus avaient tous la même hauteur ; là encore,

la déviation est inférieure à 0,5 p.cent d'absorption, ce qui ne se traduit pas par une erreur appréciable dans l'estimation du taux d'haptoglobine.

3/ nous avons enfin préparé avec le même sérum et la même solution d'Hb dans les mêmes proportions, des mélanges que nous avons soumis à l'appareil pour nous rendre compte de l'erreur que pouvait apporter la confection manuelle du complexe ; la déviation est de l'ordre de 1 p.cent de transmission en plus ; si les conditions de sensibilité de la réaction sont bonnes, cette déviation n'amène pas une erreur notable dans la détermination du taux d'Hp, mais si les conditions de sensibilité sont moins bonnes, l'erreur peut atteindre 0,1 d'indice d'Hp.

V - La longueur d'onde de lecture photométrique

L'enregistrement, au spectrophotomètre enregistreur de Beckman, du spectre de la réaction colorée au gaïacol donne le tracé ci-après :

(fig.11)

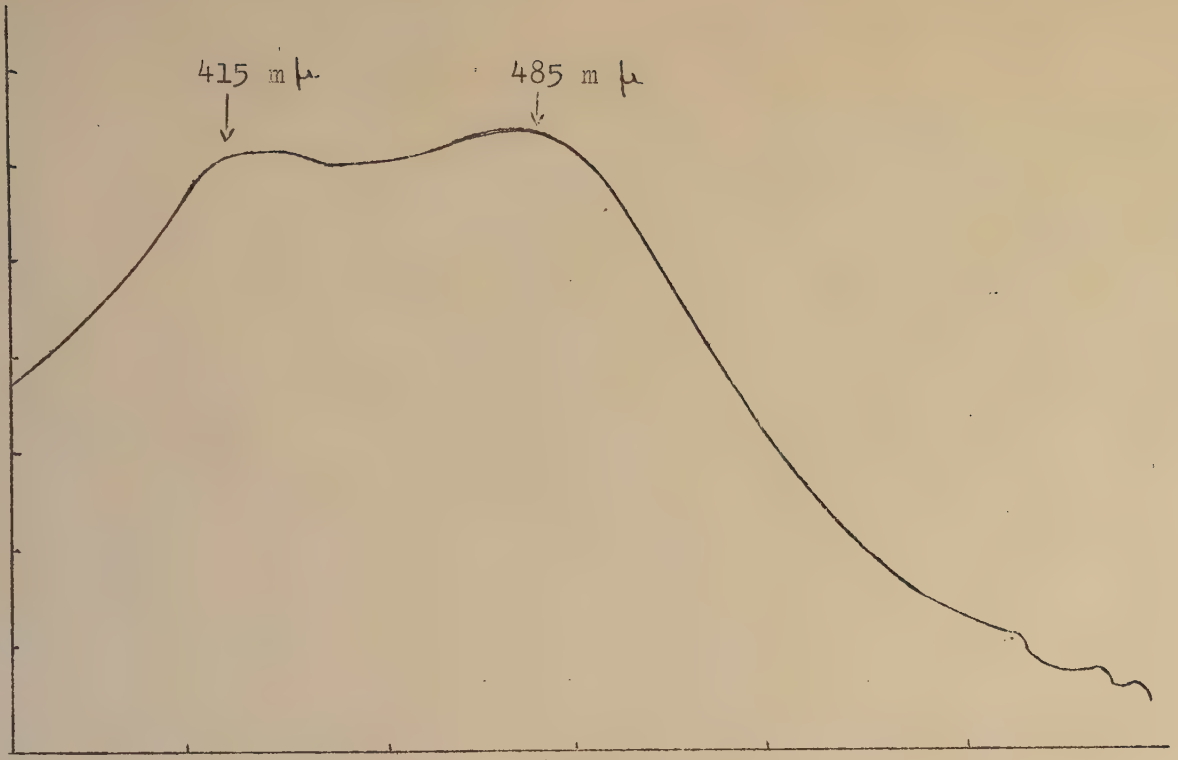


Figure 11

Etude du spectre d'absorption de la réaction d'oxydation du gaïacol

Cette courbe montre deux maximum : l'un à 485 m μ, l'autre à 415 m μ, et, entre ces deux pics, un plateau.

Au début de nos expériences, nous avons choisi la bande 480 m μ. En réalité, les faibles intensités de coloration du gaïacol oxydé sont plus visibles à 420 m μ, mais cette longueur d'onde a l'inconvénient d'être trop sensible à la couleur propre du sérum ; c'est pourquoi, en définitive, nous avons adopté la longueur d'onde de 480 m μ pour laquelle les différences de teintes des divers échantillons de sérums ont peu d'influence sur la couleur totale ; ce qui, dans la pratique, rend inutile la confection des blancs-sérums qui ont, dans 90 p.cent des cas, la même valeur tres faible (2 p.cent d'absorption).

VI - Influence de la température sur la réaction peroxydasique

L'appareil automatique nous a permis d'étudier avec beaucoup d'aisance et de précision la température optima de la réaction peroxydasique.

Pour ce faire, nous avons remplacé le bain-marie à 37° dans lequel plongeait la bobine de mélange où se fait l'équilibre thermique, par une bobine mélangeuse entourée d'un manchon dans lequel circule de l'eau ; la bobine se trouve donc toujours à la même température que l'eau circulant dans le manchon grâce à une pompe ; il est facile à ce moment, avec une grande réserve d'eau qui circule dans le manchon, d'augmenter très progressivement et de façon continue la température de l'eau de circulation avec une bougie chauffante munie d'un agitateur.

Dans ces conditions, un pompage continu de la réaction nous a donné la courbe suivante : (figure 12)

qui montre que, dans la réaction au gaïacol, et pour un temps de 45 secondes, l'intensité de coloration augmente très graduellement de 20° à 37° puis décroît ensuite très graduellement de 37° à 47° ; l'optimum de température se situe donc à 37°, avec une large marge de sécurité, puisque, entre 36° et 40° on a pratiquement un plateau.

VII - Cinétique de la reaction à l'appareil automatique

En pompant non plus les éléments séparés de la réaction, mais, pendant un temps suffisamment long, un mélange de chacun de ces éléments, et en l'envoyant dans la cuvette de mesure, on peut enregistrer très simplement la cinétique de la réaction colorée.

C'est ce que nous avons fait pour une température de 20°, d'une part avec un serum fort, d'autre part avec un sérum faible, enfin avec de la métHb seule : on voit que la forme de la courbe (fig.13) n'est pas la même pour les complexes et pour la métHb seule, ce qui montre une fois de plus, comme l'a déjà montré JAYLE, la différence d'action enzymatique des complexes Hb-Hp par rapport à l'action enzymatique de l'Hb pure.

VIII - Le problème de l'étalonnage

Dans l'état actuel de nos expériences, nous devons dire que ce probleme n'est pas complètement résolu.

a) Au cours de celles-ci, nous nous sommes toujours servis d'une gamme de sérums étalonnés par la méthode originale de JAYLE. Nous ne nous dissimulons pas que cette solution n'est qu'une solution provisoire du problème et qu'il faudra obtenir une méthode d'étalonnage autonome. Mais pour l'instant, les différentes solutions que nous avons envisagées ne se sont pas montrées entièrement satisfaisantes.

Nous avons essayé, comme le conseille OWEN, de partir d'un pool de sérums normaux, supposant qu'on obtiendrait ainsi un mélange d'indices haptoglobiniques égal à 1 ; nos essais nous ont prouvé que, étant donné la variabilité des valeurs de chaque serum normal (surtout en indices inférieurs à 1) on n'arrivait pas, par cette méthode, à avoir un melange constant dont on puisse être sûr qu'il ait un indice de 1.

Nous avons, avec plus de succès, utilisé un serum lyophilisé commercial (Versatol) dont l'indice d'Hp, pour un même lot de préparation, est assez constant et voisin de 1.

b) Expériences sur le sérum chauffé :

Pensant que le chauffage d'un sérum étalon pourrait le stabiliser, ce qui aurait permis de préparer un stock de sérums en ampoules inalterables, nous avons ete amenes à étudier l'influence du chauffage à 56° sur le serum.

Les expériences nous ont montré qu'un chauffage de 1 heure à 56° aboutissait à la perte de 80 p.cent de l'activité peroxydasique. Cette diminution d'activité est plus importante que celles qu'avait obtenu Mme

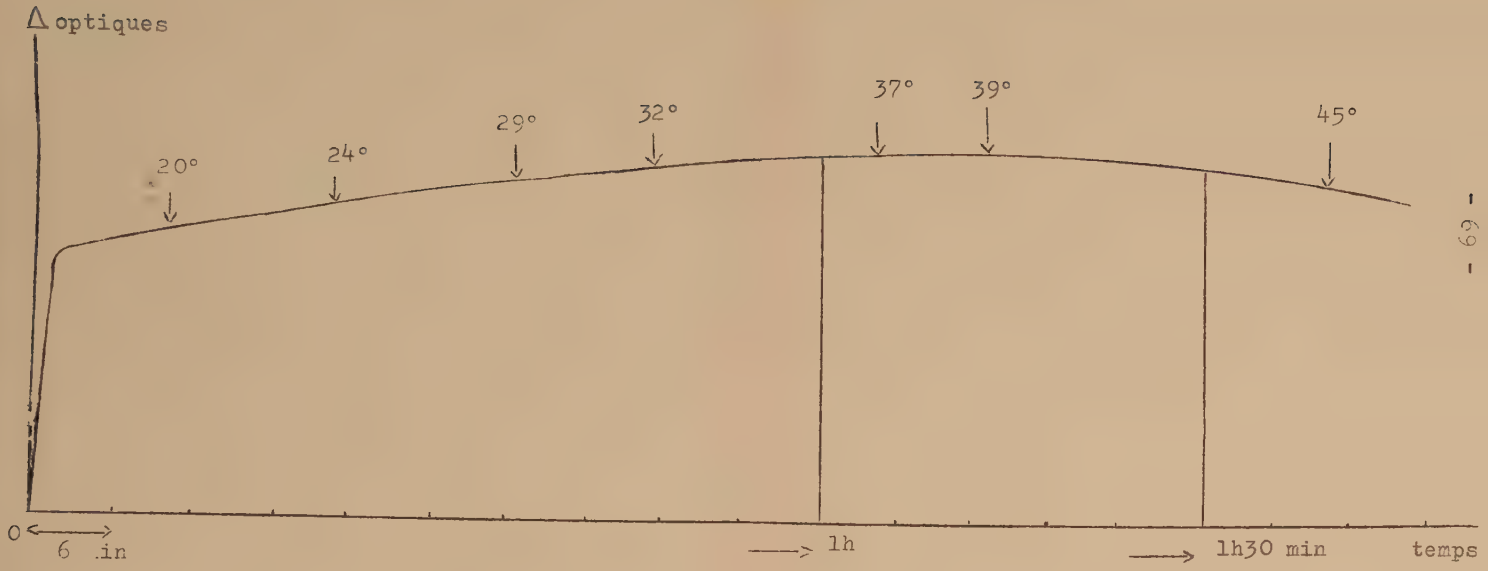


Figure 12

HERMAN BOUSSIER sur une Hp purifiée.

Le milieu sérique ne protège donc pas l'Hp contre l'effet destructeur de la chaleur.

c) Expériences sur le chauffage du complexe

Contrairement au sérum, un complexe Hp-Hb supporte très bien un chauffage de 2 heures à 56° sans perte d'activité.

On pourrait donc envisager un étalonnage basé sur la réaction d'un complexe mis en ampoules et chauffé à 56° pour le stériliser en vue de le conserver.

d) Mais évidemment, la méthode idéale serait de faire extemporanément des complexes de valeurs différentes à partir de mélanges d'une Hp titrée rigoureusement avec des sérums en proportions variées.

e) Monsieur JAYLE avec J. MORETTI et M. WAKS achève de mettre au point le principe d'une gamme étalon obtenue à partir de dilutions de quantités croissantes rigoureusement mesurées d'Hb qu'il saturait par un sérum d'indice d'Hp eleve (mesure faite par la méthode classique de JAYLE).

EN RESUME :

La méthode automatique nous paraît pouvoir donner des résultats valables du dosage de l'haptoglobine.

Sa simplicité en fait une methode qui ne demande pas un long apprentissage technique ; des précautions élémentaires de recoupement

avec des serums connus évitent à coup sûr les erreurs grossières.

Cependant, dans l'avenir, des perfectionnements pourront lui être apportés :

1/ pour la rendre entièrement automatique c'est-à-dire pour éviter la confection manuelle des complexes ;

2/ pour rendre l'étalonnage parfaitement rigoureux et autonome.

Elle nous a permis de vérifier certaines propriétés de l'haptoglobine qui avaient déjà été mises en évidence par d'autres auteurs.

-:-

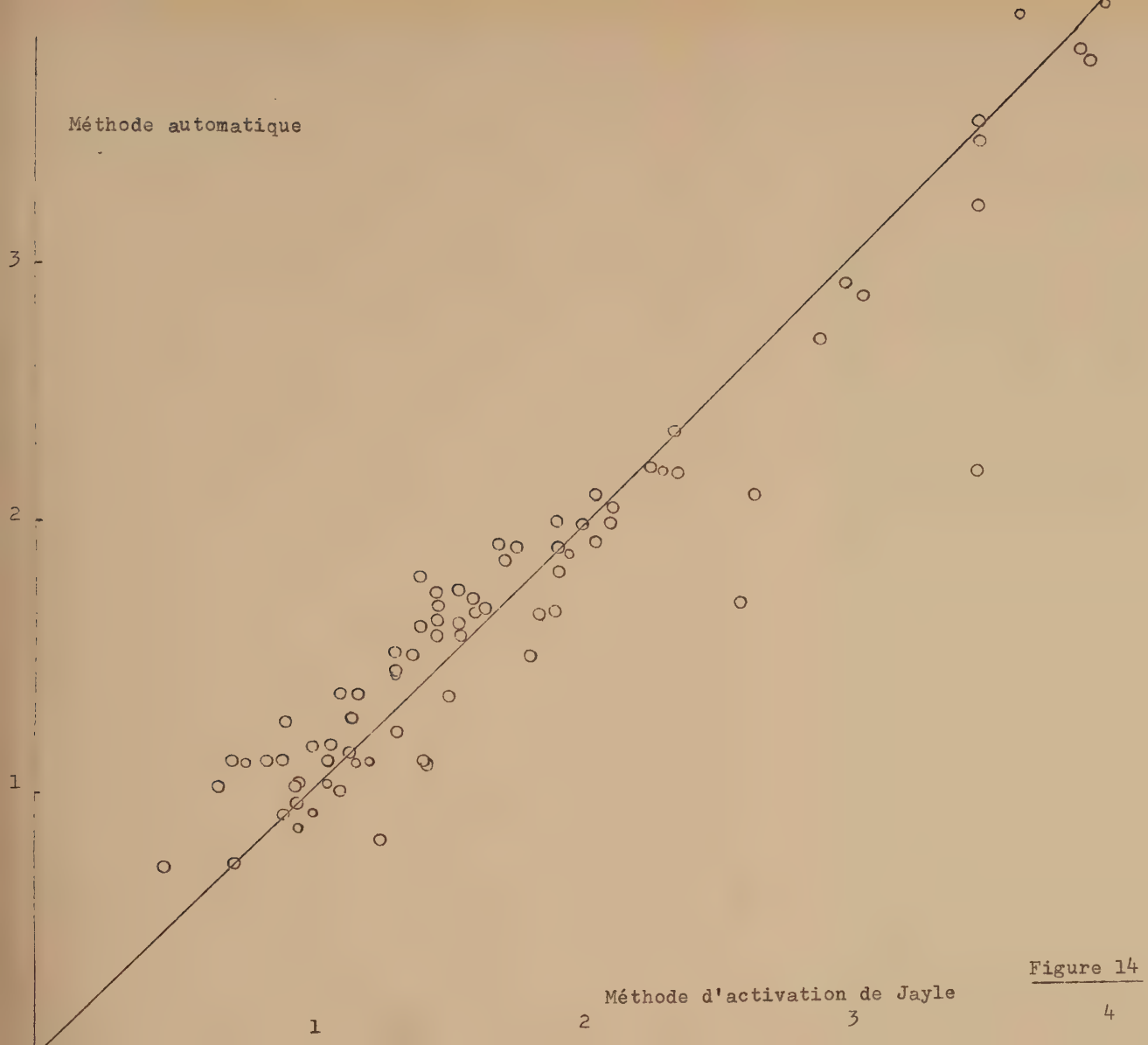

Méthode automatique
3
2
1
Méthode d'activation de Jayle
1
2
3
4

Figure 14

COMPARAISON ENTRE LA METHODE ORIGINALE DE JAYLE ET LA METHODE AUTOMATIQUE : COURBE DE CORRELATION

-:-

Nous avons établi pour 80 sérums une courbe (fig.14) de corrélation entre la methode originale de JAYLE et la méthode automatique.

Dans la grande majorité des cas, il y a correspondance satisfaisante, mais, ne nous étant pas toujours trouvés, pour des raisons matérielles, être dans des conditions de comparaison tout à fait rigoureuses, nous avons dû constater certaines discordances pour quelques sérums ; en réalité, nous avons observé que ces discordances se produisaient :

- soit lorsque le sérum était trouble,
- soit lorsqu'il y avait une hémolyse même minime.

Au contraire, il existe une coïncidence très bonne pour les sérums absolument limpides et de couleur normale.

Comme nous l'avons déjà mentionné, les conditions de prélèvement devront donc être parfaites et lorsque ces conditions ne seront pas bien remplies, nous jugeons indispensable de faire un blanc-sérum qui, pour quelques uns de ces échantillons, n'ont pas été toujours faits.

-:-

CONCLUSIONS

-:-

I - Nous avons étudié une méthode de dosage automatique de l'haptoglobine de JAYLE.

II - La réaction primitivement utilisée fut celle d'OWEN qui utilise le gaïacol comme réactif, l'eau oxygénée comme substrat et la méthémoglobine humaine pour faire le complexe peroxydasique.

III - Des essais ultérieurs nous ont amenés à utiliser l'hémoglobine de Cheval dont le complexe avec l'haptoglobine presente plus d'activité peroxydasique que la méthémoglobine humaine, puis à abandonner l'eau oxygénée qui se décompose trop facilement, pour la remplacer par l'hydroperoxyde d'éthyle M/200.

Nous avons légèrement modifié la composition du réactif au gaïacol.

IV - Nous avons étudié les différents facteurs qui affectent la réaction, déterminé la température optimale, l'incidence des proportions des réactifs, et la longueur d'onde de lecture de la réaction coloree.

Une comparaison a été faite avec la méthode originale de JAYLE qui donne une corrélation satisfaisante.

V - L'haptoglobine en milieu sérique paraît plus sensible à l'action de la chaleur qu'à l'état pur, sans que nous ayions pu tirer d'autres conclusions.

Ce n'est pas le cas pour un complexe haptoglobine-hémoglobine qui supporte mieux une température ne dépassant pas 56°.

-:-

Vu :
Le Président :
Signé : M.F. JAYLE

Vu :
Le Doyen :
Signé : L. BINET

Vu et Permis d'Imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris :
Signé : Jean ROCHE.

BIBLIOGRAPHIE

-:-

I - BOUSSIER G.
Obtention à l'état pur d'une micro-protéine sérique : L'haptoglobine.
C.R. Acad. Sc. 246, 1769-1958

2 - BOUSSIER G., MORETTI J., JAYLE M.F.
Etude de l'haptoglobine.
Bull. Soc. Chim. Biol. 42, 837, 1960

3 - CONNELL G.E. and SMITHIES O.
Human Haptoglobins : estimation and purification.
Biochim. J. 72, 115, 1959

4 - CHEFTEL R.I., CLOAREC L., MORETTI J., RAFELSON M., JAYLE M.F.
Etude de l'haptoglobine III
Bull. Chim. Biol. 42, 993, 1960

5 - GILLARD P.
Contribution à l'étude de l'haptoglobine.
Thèse de Doctorat en Pharmacie, Paris 1947 p.101

6 - GUINARD S., TONNELAT J., BOUSSIER G., JAYLE M.F.
Propriétés physiques de l'haptoglobine séromucoïde alpha-2 et de sa combinaison hémoglobinique.
Bull. Soc. Chim. Biol. 38, 329, 1956

7 - HERMAN-BOUSSIER G.
Préparation et propriétés physiques et chimiques des haptoglobines humaines.
Thèse de Doctorat es Sciences 1960, p.23

8 - JAYLE M.F.
Méthode de dosage de l'haptoglobine sérique.
Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 876, 1951

9 - JAYLE M.F.
Sur la constitution, le mécanisme d'action, le rôle biologique des peroxydases et des catalases.
Bull. Soc. Chim. Biol. 23, T 62, 1941

10 - JAYLE M.F.
Etude biochimique et physiopathologique des peroxydases animales.
Thèse Paris 1939

11 - JAYLE M.F.
Evaluation moléculaire de l'haptoglobine par une réaction enzymatique de peroxydation.
C.R. Acad. Sc. 211, 574, 1940

12 - JAYLE M.F. et ABDELLATIF
Etude de la constitution de l'haptoglobine.
Bull. Soc. Chim. Biol. 28, 81, 1946

13 - JAYLE M.F. et BADIN J.
Constitution chimique et électrophorèse de l'haptoglobine.
C.R. Soc. Biol. 144, 1475, 1950

14 - JAYLE M.F., BOUSSIER G.
Obtention à l'état homogène d'une mucoprotéine sérique, l'haptoglobine.
Bull. Soc. Chim. Biol. 36, 959, 1954

15 - JAYLE M.F. et CONAS G.
Propriétés et constitution chimique de l'Hp sérique.
Bull. Soc. Chim. Biol. 34, 65, 1952

16 - JAYLE M.F. et GILLARD P.
Précipitation saline d'une protéine définie dans un mélange hétérogène.
Bull. Soc. Chim. Biol. 29, 149, 1947

17 - JAYLE M.F., SAID ISKAK et GILLARD P.
Action de l'haptoglobine sur la catalyse peroxydasique de l'hemoglobine.
Bull. Soc. Chim. Biol. 28, 63, 1946

18 - JAYLE M.F., SERPICELLI J., et ROBERT L.
Etude polarographique des mucoïdes sulfosalicylosolubles du sérum sanguin.
Clin. Chim. Acta I, 452, 1956

19 - MARNAY A., MORETTI J., et JAYLE M.F.
Protéines particulières à différents génotypes de sérums sanguins.
C.R. Acad.Sc. 246, 847, 1958

20 - MORETTI J., BOUSSIER G. et JAYLE M.F.
Application de l'électrophorèse sur gel d'amidon à l'étude de l'haptoglobine.
C.R. Soc. Biol. 151, 832, 1957

21 - MORETTI J., BOUSSIER G. et JAYLE M.F.
Nouvelle méthode de purification des protéines par électrophorèse dans un gel d'amidon.
Bull. Soc. Chim. Biol. 40, 59, 1958

22 - MORETTI J., BOUSSIER G. et JAYLE M.F.
Réalisations techniques et premières applications de l'électrophorèse sur gel d'amidon.
Bull. Soc. Chim. Biob. 39, 593, 1957

23 - MORETTI J. et YON J.
Etude cinétique de l'activité peroxydasique du complexe hemoglobine-haptoglobine.
Bioch. et Bioph. Acta, 46, 545, 1961

24 - NYMAN M.
Serum haptoglobin.
Scand. J. of Clin. and Lab. Invest. n°39, vol.II, 1959

25 - POLONOVSKI M. et JAYLE M.F.
Sur la préparation d'une nouvelle fraction des protéines plasmatiques, l'haptoglobine.
C.R. Acad. Sc. 211, 517, 1940

26 - POLONOVSKI et JAYLE M.F.
Existence dans le plasma humain d'une substance activant l'action peroxydasique de l'hémoglobine.
C.R. Soc. Biol. 129, 457, 1938

27 - SKEGGS L.T. Junior
An automatic method for colorimetric Analysis (Généralités sur l'autoanalyseur ; utilisation de l'autoanalyseur)
Amer. J. Clin. Path. 28, 311-322, 1957

28 - SMITH A.H.
Automation in the Clinical Chemistry Laboratory.
N.C. Médical Journal 20, 423-425, 1959

29 - SMITHIES O.
Zone electrophoresis in starch gels : group variations in the serum proteins of normal human adults.
Biochem. J. 61, 629, 1955

30 - VAUX ST CYR Melle de
Etude immunoélectrophorétique des protéines perchlorosolubles des sérums humains normaux et pathologiques ; identification de certaines fractions.
Bull. Biol. Ebrids Prociding 7e coll. Bruges 1959

31 - WAKS M.
Etude et comparaison de méthodes de dosage de l'haptoglobine.
Thèse de Doctorat en Médecine 1962.

32 - OWEN J.A., BETTER F.C., HOBAN J.
J. Clin. Path. 13, 163, 1960

33 - SMITH H., OWEN J.A.
Bioch. J. (G.B.)
The determination of haptoglobins in normal human serum
78, 723, 1961

-:-

SERMENT

-:-

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes chers Condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'Exercie de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire audessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les moeurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses !

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes Confrères si j'y manque !

-:-